UNTERSUCHUNGEN ZUR EXPRESSION DES MOSAIKGENS OXI3 DER MITOCHONDRIALEN DNA VON SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Bernhard Suchy

Diss
München
1985

UNTERSUCHUNGEN ZUR EXPRESSION DES MOSAIKGENS OXI3 DER MITOCHONDRIALEN DNA VON SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Bernhard Suchy

Mai 1985

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. F. Kaudewitz

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. K. Wolf

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.1985

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Inhaltsverzeichnis

		Seite
A.	Einleitung	1
B.	Material und Methoden	7
1.	Stämme	7
2.	Genetische Bezeichnungen	7
3.	Medien und Puffer	8
4.	Chemikalien	9
5.	Methoden	10
5.1.	Mutagenese von rho$^-$-Mutanten	10
5.2.	Gewinnung von mitochondrialer DNA	11
5.3.	Gewinnung von mtRNA	12
5.4.	Analytische Auftrennung von mtRNA	12
5.5.	Überführung der mtRNA aus Agarosegelen auf DBM-Papier	13
5.6.	Gewinnung von DNA-Fragmenten	13
5.7.	^{32}P-"Nick-translation" von mtDNA	14
5.8.	Hybridisierung von filtergebundener RNA mit radioaktiver "nick-translatierter"mtDNA	14
5.9.	Wiederverwendung exponierter Filterstreifen	14
5.10.	Hybridisierung filtergebundener DNA mit ^{32}P-mtDNA	15
5.11.	DNA-Sequenzanalyse	15
5.12.	Identifizierung mitochondrialer Translationsprodukte	16
6.	Abkürzungen	17
C.	Ergebnisse	18
1.	Untersuchung von Transkripten der OXI3-Region	18
1.1.	Auftrennung mitochondrialer RNA	21
1.2.	Kalibrierung der mitochondrialen RNAs	21
1.3.	Identifizierung OXI3-spezifischer RNA	23
1.4.	Rho$^-$-Induktion und Fragmentgewinnung	23
1.5.	Induktion der rho$^-$-Stämme	24
1.6.	Rho$^-$-Restriktion und Fragmentbestimmung	24

Seite

2.	Analyse der Transkripte von mit⁻-Punktmutanten der OXI3-Region	27
2.1.	Kontrollexperiment: Kreuzhybridisierungen	30
3.	Transkriptuntersuchungen an Leaky-Mutanten	31
3.1.	Hybridisierung der mtRNA von OXI3 Leaky Mutanten mit dem ^{32}P mtDNA-Fragment F6	31
4.	Proteinuntersuchungen an OXI3-Punktmutanten	35
5.	Einwirkungen von Chloramphenicol auf die Reifung der OXI3-Messenger RNA	41
5.1.	Vergleich mit COB	44
5.2.	Überlängen	44
5.3.	Proteinwirkung	45
6.	Transkriptuntersuchungen an OXI3-Deletionsmutanten	47
6.1.	Hybridisierungen mit dem Fragment F7	54
6.2.	Hybridisierungen mit dem Fragment F4	56
6.3.	Hybridisierungen mit den Fragmenten RR5 und RR7	56
6.4.	Hybridisierungen mit dem Fragment F1 (Intron aI1)	58
6.5.	Doppelbanden	61
6.6.	Hybridisierungen mit dem Fragment F2	62
6.7.	Hybridisierungen mit dem Fragment F3	64
6.8.	Vergleich der Hybridisierungen der Fragmente F2 und F3	66
6.9.	Hybridisierungen mit einem "junction"-Fragment	66
7.	Analyse der Deletionsendpunkte von Mutanten der Gruppe B	69
7.1.	Eingrenzung der Deletionsendpunkte	69
7.2.	Sequenzierung von Junctions der Deletionsgruppe B	73
7.3.	Einordnung eines Fusionsfragmentes in die Wildtypsequenz	77
D.	Diskussion	79
1.	Prozessierungsverlauf der Messenger-RNA in Deletionsmutanten der OXI3-Region	80

Seite

2. RNA-Vorstufen in mit Chloramphenicol behandelten WT-Zellen 82

3. Zusammensetzung der Transkripte von Deletionsmutanten der OXI3-Region 85

4. Zusammensetzung der Transkripte der Deletionsmutanten der Gruppe B der OXI3-Region 91

5. Sequenzbesonderheiten im Bereich des Introns aI5b-Rest 94

6. Sequenzbesonderheiten an den Deletionsendpunkten der Gruppe B 99

7. Abschließende Betrachtungen zur Mosaikstruktur des OXI3-Gens 102

E. Zusammenfassung 105

F. Literaturverzeichnis 107

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554620_0076

A. Einleitung

Die Erbinformationen der Eukaryonten sind außer im Zellkern auch in den Mitochondrien und bei den grünen Pflanzen zusätzlich in den Chloroplasten enthalten. Die Mitochondrien haben etwa die Größe von rezenten Bakterien, enthalten die Enzyme der Atmungskette und der oxydativen Phosphorylierung und dienen somit der zellulären Energiegewinnung. Sie besitzen ein eigenes Genom sowie einen Transkriptions- und Translationsapparat zur Expression ihrer Gene. Hefe ist für Studien am Mitochondriengenom besonders geeignet, da sie als fakultativ anaerober Organismus ihre Energiegewinnung sowohl über Atmung als auch alternativ dazu, mittels Gärung durchführen kann. Der Vorteil für den Mitochondriengenetiker besteht also darin, daß er Mutationen, welche die mitochondrialen Funktionen stören, untersuchen kann, ohne daß dies für die Hefe letal wäre. Es können auch Individuen mit größeren Deletionen im Mitochondriengenom, ja auch bei völligem Verlust dieses Genoms, weitergezüchtet werden. Die mitochondriale DNA wird durch karyotisch kodierte Enzyme repliziert (Borst 1972; Schatz u. Mason 1974; Review Dujon CSH 1981).

Die Größe des Mitochondriengenoms zeigt bei den einzelnen Organismen starke Unterschiede. Die meisten tierischen Mitochondrien besitzen eine etwa 16'ooo Nukleotide umfassende DNA, während Pilze bis zum Fünffachen dieser Länge erreichen. Genome der Mitochondrien höherer Pflanzen können Längen von mehreren hunderttausend Nukleotiden aufweisen.

Das Genom der Mitochondrien ist ähnlich dem der Bakterien zu einem Ring geschlossen und hat im Fall von Saccharomyces cerevisiae eine Länge von ca. 75'ooo Basenpaaren.

Der größte Teil ihrer funktionellen und strukturellen Proteine ist kernkodiert, wird an cytoplasmatischen Ribosomen gebildet und dann in die Mitochondrien eingeschleust (Borst 1972; Schatz u. Mason 1974; Borst u. Grivell 1978). Nur etwa 5-10% der Gesamtsynthese (quantitativ) mitochondrialer Proteine liefert das Translationssystem der Mitochondrien selbst (Schweyen u. Kaudewitz 1970).

Das Mitochondrien-Genom der Hefe (Abb.1) enthält die Gene für:
die beiden ribosomalen RNAs (21S u. 15S), 25 tRNAs, eine an der tRNA-Reifung beteiligte RNA, sowie die Gene OXI1, OXI2 und OXI3, welche die Untereinheiten II, III und I der Cytochrom-c-oxidase kodieren; außerdem PHO2/OLI1, PHO1/OLI2 und aap1, welche die Untereinheiten 9, 6 und 8 der oligomycin-sensitiven ATPase kodieren, das Gen COB kodierend für Apocytochrom b und schließlich VAR, das Polypeptid kodiert, welches mit der kleinen Untereinheit der mitochondrialen Ribosomen assoziiert ist. Zusätzlich sind einige offene Leserahmen im Genom vorhanden. Die darin kodierten Proteine sind bisher nicht identifiziert. Es handelt sich also um ein Genom, das mit molekulargenetischen Mitteln gut überschaubar ist im Gegensatz zum Genom des Zellkerns. Es stellt gleichzeitig ein vorzügliches Studienobjekt der Organisation und Expression von Genen dar, da es sowohl Charakteristika von Pro- als auch von eukaryontischen Genomen aufweist.

Ein wesentlicher Vorzug des Mitochondriengenoms ist die Möglichkeit, die Prozessierung der Transkripte von Mosaikgenen zu analysieren. Ein Mosaikgen (Split-Gene) setzt sich aus Exons und Introns zusammen. Exons sind

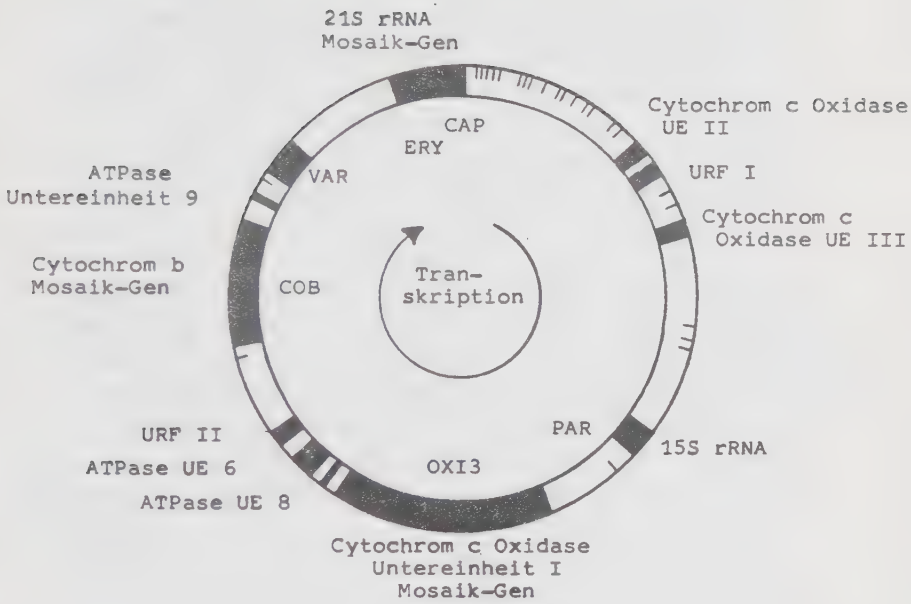


Abb.1:
Zirkuläre Karte der mtDNA von Saccharomyces cerevisiae (nach Grivell 1983, verändert).
Der Kreis stellt ein mitochondriales DNA Molekül dar. Genregionen sind durch schwarze Balken dargestellt und auf der Außenseite mit der jeweiligen Bezeichnung versehen. Den Genen mit Mosaikstruktur wurde die Bezeichnung "Mosaik" angefügt. URF bedeutet "unassigned reading frame". Die Lage der tRNA-Gene ist mit Strichen (⊥) gekennzeichnet.

Nukleotidsequenzen (offene Leserahmen) mit dem Informationsgehalt für die Aminosäuresequenz des zu translatierenden Polypeptids des Mosaikgens. Introns sind Nukleotidsequenzen, die zwischen den Exons liegen und mitunter ebenfalls offene Leserahmen enthalten. Unter Prozessierung (Processing) versteht man die Reifung des primären Transkripts eines Mosaikgens zur Messenger-RNA.

Der Gentypus des "Split-Gene's" wurde 1977 entdeckt. Eine große Zahl von Genen in den Chromosomen von Säugetieren, Vögeln, Amphibien und auch bei einigen niedrigen Eukaryonten ist durch Intron-Sequenzen unterbrochen. Gut untersuchte Beispiele hierfür sind Globingene, Immunoglobuline oder das Ovalbumingen, das aus 8 Exonabschnitten und 7 dazwischenliegenden Introns besteht.

Mosaikgenstrukturen finden sich in der Mitochondrien-DNA von Saccharomyces cerevisiae in den Genen für die große ribosomale RNA (21S), für das Apocytochrom b und für die Untereinheit I der Cytochrom-c-Oxidase (Heyting et al. 1979, Slonimski et al.1978a, van Ommen et al. 1979). Die 21S rRNA enthält nur ein Intron, während die COB-Region und die OXI3-Region wesentlich komplexere Strukturen aufweisen. Die Prozessierung der 21S-RNA ist relativ einfach und benötigt weder mitochondriale Proteine noch aktive mtRibosomen (Faye et al. 1974 und 1979).

Bei dem Gen für Apocytochrom b handelt es sich um die bestuntersuchte Region des Hefe-Mitochondriengenoms. Während der letzten Jahre wurde die COB-Region (oder box-Region) der Hefe-Mitochondrien DNA von mehreren Arbeitsgruppen intensiv untersucht (Review Borst-Grivell 1981).

Unter Verwendung einer großen Zahl von COB-Mutanten konnte mit genetischen bzw. biochemischen Mitteln und auch unter Anwendung von Elektronenmikroskopie und Sequenzierung gezeigt werden, daß es sich bei dieser Region um ein Mosaikgen handelt (Grivell et al. 1979, Lazowska et al. 1980, Nobrega und Tzagoloff 1980 u. Weiss-Brummer et al. 1982). Es gliedert sich in 6 Exons und 5 Introns, wobei 3 der Introns offene Leserahmen aufweisen, die in Phase mit den vor ihnen liegenden Exons verlaufen (Lazowska et al. 1980 u. Nobrega u. Tzagoloff 1980, 1982). Dabei bildet der offene Leserahmen des Introns 2 zusammen mit Exon 1 und Exon 2 ein Produkt, das bei der Prozessierung der COB-RNA zum reifen Messenger eine wichtige Rolle spielt und deshalb von Slonimski und Mitarbeitern "Maturase" genannt wurde (Jacq et al. 1980 und Lazwoska et al. 1980). Dieses Maturasemodell war ein wichtiger Schritt in der Aufklärung der überaus komplizierten Vorgänge bei der Reifung der Messenger-RNA von Mosaikgenen.

Das dritte Mosaikgen der Hefe-mtDNA ist die OXI3-Region (Abb.2 ,Seite 3). Sie liegt zwischen den Genorten für Oligomycin- und Paromycin-Resistenz. Der komplexe Aufbau der OXI3-Region zeigt sich schon daran, daß sie erheblich länger ist als dies für die Kodierung der Untereinheit I der Cytochromoxidase nötig wäre. So hat diese Region im Stamm D273-10B eine Länge von ca. 10°000 bp bis hin zu 12°500 bp im KL14-4A, wohingegen für die Kodierung der Untereinheit I mit einem Molekulargewicht von ca. 45°000 lediglich etwa 1°500 bp der DNA nötig wären. Obendrein zeigt die Region einen Polymorphismus derart, daß in einigen Wildtypen (lange Form) Introns vorkommen, die anderen Wildtypen fehlen (kurze Form). Nach Sequenzierung dieser Region konnten durch Homologieanalysen der Untereinheit I der Cytochrom-c-Oxidasen von Hefe-, Mensch-

und Mausmitochondrien im WT - Stamm D273-10B 8 Exons und 7 Introns differenziert werden (Anderson-Bibb 1981). Durch Arbeiten von Hensgens et al. 1983a wurden im Stamm KL14-4A die Sequenzen der beiden zusätzlichen Introns A5a und A5b bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit sollte ein Beitrag zum Studium des Prozessierungsverlaufs vom Primärtranskript zum reifen Messenger der OXI3-Region bei verschiedenen Punktmutanten geleistet werden, und ferner die eventuelle Restprozessierung bei größeren Deletionen untersucht werden. Zur Beantwortung dieser Fragen wurde eine Reihe von verschiedenen Methoden eingesetzt, um so eine Analyse der Gen-Expression von verschiedenen Ebenen her zu ermöglichen. So wurden im ersten Teil der Arbeit rho$^-$-Klone der OXI3-Region induziert, um angereichert spezifische Fragmente nur dieser Region gewinnen zu können, die dann mittels Restriktionskartierung und Southern-Blot definiert wurden. Parallel zu der häufig verwendeten Nothern-Blot-Hybridisierungstechnik, die der Identifizierung der transkribierten RNA dient, wurden Protein-Untersuchungen zum Nachweis veränderter Translation und Assemblierung bei Punktmutationen durchgeführt. Schließlich sollte außerdem die Sequenzierung der für einige Deletionsmutanten der OXI3-Region charakteristischen Endpunkte die RNA-Untersuchung auf DNA-Ebene ergänzt werden.

B. MATERIAL UND METHODEN:

1. Stämme:

Stamm	Genotyp Kern	mitochondrial	Herkunft
777-3A	,ade1,op1	rho^+mit^+	Kotylak et al., 1976
oxi 3^- Mutanten	,ade1,op1	rho^+mit^- abgel.v.777-3A	siehe Bruckner 1984
KL14-4A	a,his1,trp2	rho^+,cap^r -321 oli^r1-1,par^r-454	Wolf et al., 1973
rho^-- Mutanten	a,his1,trp2	rho^-, Praefix H	abgel. vom KL 14-4A
RM590-9D	a,trp1	rho^o	Schweyen et al., 1978
D273-10B		rho^+mit^+	Sherman et al., 1968

2. Genetische Bezeichnungen:

rho^+mit^+: Wildtyp (WT), die mit DNS ist nicht erkennbar mutativ verändert

rho^+mit^-: die mit DNS hat eine mutative Veränderung, die zum Ausfall einer mitochondrialen Funktion führt (Punktmutation oder kurze Deletion)

rho^- : Makrodeletion, die zum Verlust des mitochondrialen Translationssystems führt. Nicht deletierte mit DNS wird genetisch stabil weitervererbt

rho^o : Vollständiger Verlust der mitDNS

3. Medien und Puffer

YD-Medium

Yeastextrakt	10g	Glukose	30g
Agar (Difco)	10g	H_2O dest. ad 1Ltr.	

YGal-Medium

wie YPD-Medium, aber statt Glukose Galaktose zugeben

YG-Medium

wie YPD-Medium, aber statt Glukose 30 ml Glyzerin

YNB-Agar

Difco Yeast-Nitrogen Base	7g	Glukose	30g
Agar (Difco)	15g	H_2O dest. ad 1Ltr.	

Flüssigmedien

Sie enthielten die gleiche Zusammensetzung wie oben beschrieben, jedoch ohne Zusatz von Agar.

LSM-Medium ("low sulphate medium")

Stammlösungen				Spurenelemente		
Salze	$(NH_4)H_2PO_4$	60	g	Borsäure	500	mg
	MgCl	1,9	g	$CaSO_4$	40	mg
	NH_4Cl	16,2	g	$MnSO_4$	400	mg
	KH_2PO_4	10	g	KJ	100	mg
	NaCl	1	g	Na_2MoO_4	200	mg
	CaCl	1	g	$ZnSO_4$	400	mg
	H_2O dest.	900	ml	H_2O dest. ad 1Ltr.		

$FeCl_3$-Lösung $FeCl_3 \times 6H_2O$ 200 mg
H_2O dest. ad 1Ltr.

Vitamine	Ca-pantotenat	80 mg	Inositol-Lösung
	Thiamin-HCl	80 mg	
	Pyridoxin	80 mg	
	Nicotinsäure	20 mg	
	Biotin	0,8 mg	
	H_2O dest.ad	200 ml	

LSM-Zusammensetzung:

Salze	90 ml	Inositol	1 ml
Spurenelemente	1 ml	$FeCl_3$ 6 H_2O	1 ml
Vitamine	1 ml	H_2O dest. ad	1 Ltr.

4. Chemikalien

Acrylamid	BDH Ltd. Poole, England
Agarose	Seakam, Marine Colloids, USA
BSA	Behring, Marburg
CAP	Bayer, Leverkusen
CHX	Serva, Heidelberg
Dithiothreiol	Sigma, St. Louis, USA
EDTA	Sigma, St. Louis, USA
N,N'Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg
Polyacrylamid	BDH Ltd., Poole, England
SDS	BDH Ltd., Poole, England
Tris	Sigma, St. Louis, USA
tRNA	Boehringer, Mannheim
Zymolase	Kirin Brewery Co. Ltd., Japan
Methylquecksilber(II)-OH	Ventron, Karlsruhe
Formamid	Fluka, Buchs, Schweiz
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Radioaktive Substanzen	Amersham-Buchler, Braunschweig
Bisbenzimid	Riedel de Haen, Hannover

5. Methoden:

5.1. Mutagenese von rho$^-$-Mutanten

a) Verwendung von $MnCl_2$

Der WT-Stamm KL 14-4A wurde in YPG-Medium bis zum Titer von ca. 8×10^7 Zellen/ml angezüchtet. Dann mußten die Zellen in YPD-Medium auf einen Titer von 1×10^4 Zellen/ml verdünnt werden. Diesem Medium war das Mutagen in Konzentrationen von 100, 200 bzw. 300 µg/ml zugesetzt. Dann wurde erneut bis zur stationären Phase inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen auf Platten mit YPD Festmedium ausplattiert und nach mehreren Tagen Bebrütung auf YPG-Platten überführt, welche eine Unterscheidung zwischen atmungskompetenten und atmungsdefekten Zellen erlaubten.

b) Verwendung von Ethidiumbromid

EB ist ein besonders potentes Mutagen für die rho$^-$ - Induktion (Deutsch et al. 1974). Die Behandlung der Zelle verlief im wesentlichen wie bei der $MnCl_2$-Induktion. EB wurde in Konzentrationen von 20, 40 und 60 µg/ml im Reaktionsansatz verwendet. Die Isolationen der entstandenen atmungsdefekten Klone erfolgte wie bei der Manganchlorid-Mutagenese.
Weitere Einzelheiten finden sich im entsprechenden Ergebnisteil.

5.2. Gewinnung von mitochondrialer DNA

Für die DNA-Präparation sind die Zellen über Nacht in Glukose (YD-Medium) bzw. Glycerin (YG-Medium) bis zu einem Titer von ca. 1×10^8 gezüchtet worden. Dann wurde die gleiche Menge frisches Medium zugegeben und die Zellen nochmals 2-4 Std. angezüchtet, bis neue Hefeknospen im Mikroskop sichtbar waren. Zur Gewinnung der Mitochondrien mußten die Zellen mechanisch aufgeschlossen werden (Lang et al. 1977). Dazu wurden die Zellen in Sorbitolpuffer (0,6 M) zusammen mit Glasperlen geschüttelt. Der Prozentsatz der aufgebrochenen Zellen wurde mikroskopisch verfolgt. Bei einem Teil der Hefestämme wurden die Mitochondrien nach vorausgegangener Protoplastierung der Hefezellen mit Zymolase und ß-Mercaptoäthanol gewonnen (Lewin et al.,1978). Die Mitochondrien wurden anschließend durch wiederholtes Zentrifugieren und Waschen bei 4° C aus dem Zellaufschluß pelletiert und gegebenenfalls bei -20° C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Im nächsten Präparationsschritt konnten die Mitochondrien mit Hilfe von SDS (1-2%) lysiert werden. Nach einer Äthanol-Präzipitation wurde dieses Nukleinsäuregemisch in TE-Puffer gelöst. Bei einem Teil der Präparationen erfolgte eine Proteinase K Behandlung (100 µg/ml; 2 h bei 37° C). Um nicht-mitochondriale DNA und RNA aus dem Gemisch zu entfernen, mußten anschließend CsCl- oder NaJ-Dichtegradienten gefahren werden. Die CsCl-Gradientenzentrifugation erfolgte in einer CsCl-Lösung von 1,59 g/cm^3 mit 1 µg Bisbenzimid (Müller und Gautier, 1975).

Die NaJ-Gradientenzentrifugation wurde in einer NaJ-Lösung mit einem Brechnungsindex von 1,4295 zusammen mit 1 µg EB/ml durchgeführt.

Die Ultrazentrifugation wurde bei 20° C zwei Tage lang (CsCl) oder vier Tage lang (NaJ) bei 40'000 rpm mittels Titan-Rotoren in Beckmann-Ultrazentrifugen durchgeführt. Nach der Zentrifugation mußte das Bisbenzimid aus den NaJ-Lösungen mit Isoamylalkohol, aus CsCl-Lösungen mit Iso-propanol mittels Extraktion von der DNA entfernt. Dann wurde in TE-Puffer ca. 48 Stunden bei Raumtemparatur dialysiert. Vor der Weiterverwendung war es erforderlich, die DNA mit Äthanol bei -20° zu fällen. (Rotoren Ti50 bzw. Ti60).

5.3 Gewinnung von mtRNA

Für die RNA-Präparationen wurden die Stämme in YGal-Medium bei 32° C bis zu einem Titer von 3-7 x 10^7 Zellen/ml gezüchtet. Damit sollte der Glukose-Repressions-Effekt (Böker et al. 1976) vermieden werden. Die Isolation der Mitochondrien erfolgte wie unter "Gewinnung von mtDNA" beschrieben.

Die Mitochondrien wurden mit 1-2% SDS lysiert. Danach erfolgte eine Phenol-Extraktion, um Proteine zu entfernen. Anschließend mußte die RNA mit Äthanol und 0,3 M Na-Acetat bei -20° gefällt werden. Bei großen Ausbeuten wurde die RNA noch mittels LiCl (0,3 M) durch erneute Präzipitation gereinigt (siehe auch Morimoto et al. 1979).

5.4 Analytische Auftrennung von mtRNA (Gelelektrophorese)

Die mtRNA wurde auf 1,5%igen, senkrechten Agaroseplattengelen der Größe 13 x 18 x 0,2 cm aufgetrennt. Sollte lediglich eine Überprüfung der Qualität und Reinheit der mtRNA durchgeführt werden, so geschah dies unter Verwendung von 6M Harnstoff als Denaturierungsmittel. Im allgemeinen wurden Gele mit sechs Taschen und ca. 1-5 µg RNA pro Tasche gefahren.

Für die Hybridisierungsexperimente (Northern Blots) diente Methylquecksilber (II)hydroxid (5mM) als Denaturierungsmittel. Auch in diesem Fall wurden 1,5%ige Agarosegele verwendet. Die Elektrophorese erfolgte 4-5 Std. bei Raumtemperatur (Bailey et al. 1976). Das Anfärben der Gele mit einer EB-Lösung (1 µg/ml) erlaubte die Sichtbarmachung und das Fotographieren der RNA mittels UV-Durchlicht.

5.5. Überführung der mtRNA aus Agarosegelen auf DBM-Papier

Der Transfer der mtRNA auf Diazobenzyloximethylpapier (DBM) wurde, mit geringfügigen Änderungen, nach der Vorschrift von Alwine et al. (1977) durchgeführt. Dabei konnten die Gele mittels des nahezu gleichen apparativen Aufbaus wie bei Southern-Blot verwendet werden. Die RNA bindet dabei über ihre Basen mit den Diazogruppen des DBM-Papiers und wird daran kovalent gebunden. Das reaktionsfähige DBM-Papier wurde aus dem ABM-Papier erst kurz vor Gebrauch hergestellt. Als Transfermedium diente 25 mM Kaliumphosphat-Puffer bei 4° C.

5.6. Gewinnung von DNA-Fragmenten

Der Restriktionsverdau wurde mit entsprechenden Endonukleasen gemäß den angegebenen Inkubationsbedingungen der Hersteller der Enzyme durchgeführt. Die entstehenden Fragmente wurden auf horizontalen Agarosegelen (0,7-1,5%) gemäß ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte in TEB-Puffer (90 mM Tris, 90 mM Borat, 2,5 mM EDTA, pH 8) zusammen mit 1-2 µg/ml EB.

DNA-Fragmente, die für weitere Experimente verwendet werden sollten, wurden direkt aus dem Gel ausgeschnitten und in einem kleinen Dialyseschlauch durch Elektroelution gewonnen.

5.7. ^{32}P-"Nick-translation" von mtDNA

Isolierte mitochondriale Restriktionsfragmente wurden mit ^{32}P-Triphosphaten nach der Methode von Rigby et al. (1977) markiert. Die Inkubation erfolgte zusammen mit DNA-Polymerase I (Boehringer, Mannheim) und einem vom Hersteller angegebenen Puffer, aber ohne DNAse Zusatz, für 1-4 Stunden. Die Abtrennung der nicht eingebauten ^{32}P-Triphosphate konnte über eine Sepharose G-50-Säule erreicht werden. Die auf diese Weise gesammelten Fraktionen wurden bei -20° C aufbewahrt.

5.8. Hybridisierung von filtergebundener RNA mit radioaktiver "nick-translatierter" mtDNA

Zunächst mußte eine Vorinkubation bei 37° C in Denhardt's Lösung (in 6 x SSC), 1% Glycin, 33 % Formamid, und 1 mg/ml Heringsperma-DNA für 4-20 Stunden vorgenommen werden.
Die Hybridisierung erfolgte im gleichen Gemisch, aber ohne Glycin. Die Inkubation erfolgte in Plastiktüten. Dem Gemisch wurde einzelsträngige ^{32}P-mtDNA zugefügt und das Ganze wurde bei 37° C über Nacht inkubiert. Nach einem Waschvorgang mußten die Filterstreifen bei 70° C mit einer CAWO-SE-6 Verstärkerfolie auf Kodak X-ray Film autoradiografiert werden.

5.9. Wiederverwendung exponierter Filterstreifen

Nach erfolgter Autoradiografie konnten die Filterstreifen in einigen Fällen für eine weitere Hybridisierung wiederverwendet werden. Dazu wurde die ^{32}P-mtDNA mittels Waschen in 90% Formamid (bei 60° C) entfernt (Haid, persönliche Mitteilung).

5.10. Hybridisierung filtergebundener DNA mit ^{32}P-mtDNA

Der Transfer von DNA aus den Agarosegelen auf die Nitrocellulosefilter erfolgte gemäß der Vorschrift von Southern (1975). ^{32}P markierte mtDNA Fragmente mußten zusammen mit den Filtern und dem Hybridisierungsgemisch in Plastiktüten über Nacht bei 60° C inkubiert werden. Der Hybridisierungsmix bestand aus 3 x SSC, Denhardt's Lösung (0,02 % Ficoll, 0,02 % BSA, 0,02 % Polyvinylpyrrolidon in 3 x SSC; Denhardt, 1966), 0,1 % SDS und 50 µg/ml denaturierte Heringsperma-DNA. Nach einem Waschvorgang wurden die Filter getrocknet und mit einer Verstärkerfolie und Kodak X-ray-O-mat Film autoradiografiert.

5.11. DNA-Sequenzanalyse

Sequenziert wurde ein Restriktionsfragment (F10; 646 bp) mit zwei verschiedenen "sticky ends". Diese können für eine radioaktive Endmarkierung mit α^{32}P NTP verwendet werden. Mit Hilfe der Klenow-Polymerase konnte wahlweise α^{32}P-ATP (HinfI-site) bzw. α^{32}P-CTP (HpaII-Site) eingebaut werden. Die Identifizierung und Gewinnung der markierten Fragmente erfolgte aus 1%igen Agarose-Plattengelen.
Die Restriktionsfragmente wurden einer chemischen Degradation nach Maxam und Gilbert (1977) unterzogen. Die Auftrennung der dadurch entstehenden Vielzahl von Einzelbanden erfolgte in Acrylamidgelen. Dabei wurden Acrylamidkonzentrationen von 20 % bzw. 8 % gewählt, je nachdem wieweit von dem markierten Ende weg gelesen werden sollte. Zum Einsatz kamen Vertikalgele einer Größe von 50 cm bzw. 20 cm mit 0,5 mm Spacern. Bei einer konstanten Spannung von 2000 V wurden die Sequenzgele je nach aufzulösender Strecke zwischen 4 bzw. 16 Stunden gefahren. Für die Autoradiografie erwies sich auf Kodak XR 5 Röntgenfilm mit CAWO SE 6

Verstärkerfolien in lichtdichten Holzkästen bei -70° C als zweckmäßig.

5.12. Identifizierung mitochondrialer Translationsprodukte

Die Züchtung der Hefezellen, das Aushungern und ihre radioaktive Markierung erfolgte nach der Methode von Douglas und Butow (1976).
Um eine höhere Markierung zu erreichen, wurde der Stamm 777-3A und seine Mutanten mit dem rho° Stamm RM 590-9D gekreuzt. Die diploiden Zellen wurden in Galaktosemedium (2%) gezüchtet. Dann mußte eine Vorinkubation mit CAP (4mg/ml) in einem "Low sulfat medium" (Haid et al. 1979) durchgeführt werden. Die Markierungszeiten mit $^{35}SO_4^{2-}$ betrugen 15, 30 und 45 Minuten.
Die markierten mitochondrialen Polypeptide konnten in vertikalen Plattengelen aufgetrennt werden (Douglas und Butow 1976). Die Trenngele wiesen einen exponentiellen Gradienten der Acrylamidkonzentration von 10-15 % auf.
Die Elektrophorese wurde mit 30 mA bei ca. 70 V über Nacht durchgeführt. Die getrockneten Gele wurden mit einem X Omat Röntgenfilm (Kodak) autoradiografiert.

6. Abkürzungen

ABM	Aminobenzyloximethyl
b / bp	Basen / Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CAP	Chloramphenicol
CHX	Cycloheximid
cpm	counts (Zerfälle) pro Minute
DBM	Diazobenzyloximethyl
DNA	Desoxiribonukleinsäure
mtDNA	mitochondriale DNA
D	Dalton
EB	Ethidiumbromid
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Äthylendiamintetraazetat
kb	Kilobasen
MG	Molekulargewicht
MHg-OH	Methylquecksilber(II)hydroxid
N	Nukleotide
NBPC	Nitrobenzyloximethylpyridinchlorid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	Messenger-RNA
mtRNA	mitochondriale RNA
r / tRNA	ribosomale / transfer-RNA
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumlaurylsulfat
SSC	Standard-Saline-Citrat-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEB	Tris-EDTA-Borat
Tris	Tris(hydroximethyl)aminomethan
UE (SU)	Untereinheit
WT	Wildtyp

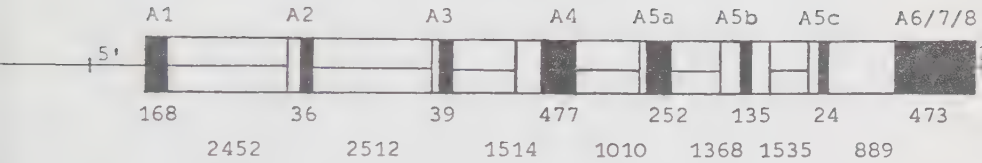
C. Ergebnisse

1. Untersuchung von Transkripten der OXI3-Region

Eine Reihe von Untersuchungen haben gezeigt, daß die OXI3-Region ein Mosaikgen ist, das die Untereinheit I der Cytochrom-c-Oxidase kodiert. Es werden kodierende Sequenzen (Exons) durch oft wesentlich längere Introns, welche nicht die UE I OXI3 kodieren, unterbrochen (Abb. 2). Es wurden 8 Exons und 7 Introns nachgewiesen (Bonitz et al. 1980b; Hensgens et al. 1983a). Bei den einzelnen für diese Analysen verwendeten Hefestämmen zeigten sich im Intron 5 von OXI3 deutliche Unterschiede. Erkennbar ist das an den zusätzlichen Introns 5a und 5b, wodurch zwischen Stämmen mit langem Genom und kurzem Genom unterschieden werden muß (Abb. 3). Transkriptstudien der Amsterdamer Gruppe führten zu dem Ergebnis, daß der reife Messenger der OXI3-Region eine RNA der Größe 18S ist. Diese RNA-Spezies hybridisiert diskontinuierlich und weist den kleinsten S-Wert von RNA auf, mit der Exon DNA-Proben hybridisieren (van Ommen et al. 1979; Bonitz et al. 1980b; Hensgens et al. 1983b). Das primäre Transkript wird über eine Reihe von Zwischenstufen zum reifen Messenger geführt.

In der vorliegenden Arbeit sollte unter anderem eine Transkriptuntersuchung verschiedenartiger Mutanten der OXI3-Region durchgeführt werden, um den Prozessierungsverlauf der RNA dieses Gens detailliert zu analysieren. Dazu wurden die WT-Stämme KL14-4A, 777-3A und von diesen abgeleitete Mutanten verwendet.
Um die Vorgänge bei der Prozessierung der RNA des OXI3-Gens zu analysieren, sollte zunächst die Anzahl der identifizierbaren Zwischenstufen festgestellt werden. Dann ist es notwendig, die Längen der auftretenden Teiltranskripte

Das Mosaikgen OXI3



Die Zahlenangaben beziehen sich auf eigene Sequenzdaten und auf veröffentlichte Werte von Bonitz et al. 1980 (D273-10B) und Hensgens et al. 1983 (KL14-4A).

■ = Exon ▭ = offener Leserahmen

□ = Intron

Abb. 2:

Darstellung des Mosaikgens OXI3

zu berechnen. Die Längenunterschiede dieser Teiltranskripte lassen Rückschlüsse auf die von Stufe zu Stufe exzisierten Introns zu. Die Zusammensetzung der nachgewiesenen Prozessierungsstufen läßt sich schließlich durch die Verwendung spezifischer DNA-Fragmente aufklären. Die Zusammenfassung dieser Ergebnisse sollte dann Aussagen über die Reihenfolge der Exzision der Introns zulassen. Für diese genannten Untersuchungen werden im folgenden der Wildtyp selbst, Punktmutanten aus der gesamten Region, Leaky-Mutanten und Deletionsmutanten mit stark verkürztem OXI3-Gen verwendet. Um auch den katalytischen Einfluß von mitochondrial kodierten Proteinen festzustellen, sollte auch mit Chloramphenicol behandelte RNA analysiert werden.

Abb. 3:

Physische Karte der OXI3 Region mit Darstellung der Herkunft der zirkulären RNAs (nach Hensgens et al. 1983b verändert). WT-Stämme von Saccharomyces cerevisiae mit langem Genom sind KL14-4A und 777-3A ; mit kurzem Genom D273-10B.

1.1. Auftrennung mitochondrialer RNA

Da RNA-Moleküle im allgemeinen zu räumlichen Überstrukturen gefaltet sind, ist es nötig diese Strukturen vor weitergehenden Untersuchungen aufzuheben (Bailey et al. 1976; Lehrach et al. 1977). Liegen die Moleküle dann denaturiert vor, lassen sie sich durch Elektrophorese, z.B. in Agarosegelen, gemäß ihrem unterschiedlichen Molekulargewicht auftrennen. Für die im folgenden beschriebenen Untersuchungen wurde Methyl-Quecksilberhydroxid als Denaturierungsmittel verwendet, welches bereits bei einer Konzentration von 5 millimolar vollständig denaturierend wirkt (Haid, persönliche Mitteilung). Diese Methode wurde im Hinblick auf die direkte Vergleichbarkeit mit bereits vorhandenen Ergebnissen von Transkriptuntersuchungen am COB-Gen der Münchner Arbeitsgruppe verwendet.

1.2. Kalibrierung der mitochondrialen RNAs

Zur Molekulargewichtsbestimmung der im Agarosegel aufgetrennten RNA-Moleküle wurden in der vorliegenden Arbeit die ribosomale 15S-mtRNA (1686 b) und die ribosomale 21S-mtRNA (3273 b) verwendet (Grivell 1984), welche mit Ethidiumbromid angefärbt im Gel gut sichtbar sind (Tab. 1). Die Längen der ribosomalen mtRNAs sind bekannt aus S1-Nuklease Analysen (Tabak et al. 1979). Die Molekulargewichtsbestimmung war in dem verwendeten Gelsystem nur im Bereich von 10S bis 28S exakt möglich (siehe auch van Ommen et al. 1979), während höhere S-Werte nur angenäherte Werte sind (Tab. 1). Die Wandergeschwindigkeit von RNAs größer als 28S hängt dann weniger vom Molekulargewicht, als vielmehr von der angelegten Spannung ab. Die nach der oben geschilderten Methode gefahrenen Gele ließen sich in ihrer Kalibrierung auch gut mit den Gelen anderer Arbeitsgruppen vergleichen.

S - WERTE TABELLE

S - WERTE	LÄNGE (N)
34	ca. 7500
32	6150
30	5600
28	5050
26	4500
23	3750
21	3200 (HEYTING et al. 1979)
20	2900
18	2200
15	1600 (TABAK et al. 1979)
11	ca. 800

Tab. 1:

S - Werte der RNA und die entsprechenden Längen von OXI 3 Transkripten im Methylquecksilberhydroxid - Gelsystem.

Die Messung der S-Werte und der umgerechneten Längen der Transkripte erfolgte durch Eichung der Gele mit 15S mt-r-RNA und 21S mt-r-RNA als Marker.

1.3. Identifizierung OXI3-spezifischer RNA

Der Nachweis der RNA-Moleküle der OXI3-Region erfolgte mittels Hybridisierung von ^{32}P-markierten DNA-Proben dieses Gens. Die radioaktiven Proben wurden dabei mit auf Diazobenzyloximethyl-Papieren gebundenen RNAs inkubiert (Alwine et al 1977). Dadurch, daß die RNA-Moleküle an die DBM-Gruppen kovalent gebunden werden, waren auch Dehybridisierungen und Neuhybridisierungen mit anderen DNA-Proben am gleichen Blot-Filterpapier möglich. Dadurch wurde ein direkter Vergleich der Autoradiogramme untereinander erleichtert.

1.4. Rho$^-$-Induktion und Fragmentgewinnung

Zur Gewinnung von Restriktionsfragmenten für Hybridisierungen (Northern;Southern) eignen sich sogenannte rho$^-$-Stämme. Rho$^-$-Mutanten sind Hefe-Mitochondrienstämme, die große Teile ihres Genoms deletiert haben. Das zurückbehaltene DNA-Stück wird in den Mitochondrien aber bis zur ursprünglichen Gesamt-Genomlänge von ca. 25 µm (Faye et al. 1973; Locker et al. 1974 a,b) amplifiziert. Durch diese Reiteration der rho$^-$-DNA kommt es zu einer natürlichen Klonierung des gewünschten Genom-Abschnittes. Dies macht man sich vor allem aus zwei Gründen zunutze:

a) Das aus Zellen eines rho$^-$-Klons gewonnene DNA-Fragment ist im Gegensatz zur Fragmentgewinnung aus dem Wildtyp nicht mit anderen Teilen des Genoms kontaminiert, da diese deletiert sind.

b) Da die Vermehrung des DNA-Monomers durch Reiteration zu mtDNA Mengen wie in rho$^+$-Stämmen führt, erhält man bei der Präperation eine höhere Ausbeute eines gewünschten DNA-Fragmentes, als bei der Verwendung des Wildtyps.

1.5. Induktion der rho$^-$-Stämme

Um geeignete rho$^-$-Stämme für die Gewinnung von OXI3-Restriktionsfragmente zu erhalten, wurde eine rho$^-$-Induktion durchgeführt. Derartige Mutanten entstehen spontan mit einer Häufigkeit bis zu 1 %, jedoch führt die Induktion durch Mutagene wie z.B. $MnCl_2$ oder Ethidiumbromid (EB) zu wesentlich höheren Ausbeuten (Waring 1966). Die erhaltenen Mutanten wurden unter Zuhilfenahme von mitochondrialen Punktmutanten, sogenannten Markern, genetisch getestet. Dabei wurde ein Raster von 11 mit$^-$-Punktmutanten, bei einer Einteilung der Region in 25 Cluster (Bruckner 1984),gewählt. Diese relativ weitmaschige Längenbestimmung der rho$^-$-Mutanten wurde durch Restriktionskartierung ergänzt.

1.6. Rho$^-$-Restriktion und Fragmentbestimmung

Das Ziel der oben genannten Induktionsreihen war im wesentlichen die Gewinnung von rho$^-$-Klonen, die dann der Bereitstellung von Restriktionsfragmenten für die geplanten Hybridisierungen dienen sollten. Für diesen Zweck wurden im folgenden vor allem die rho$^-$-Klone BM1 und BM1 sub2 gewählt. Außerdem kam der Klon HD1 zur Anwendung (Abb. 4). Ihre mtDNA überspannt einen sehr großen Teil der OXI3-Region, weshalb aus ein und derselben rho$^-$-"Petite" durch Wahl geeigneter Restriktionsenzyme schließlich Fragmente aus verschiedenen Teilen des Gens herausgeschnitten werden konnten. Die DNA-Fragmente wurden durch Vergleich mit dem Restriktionsmuster des Wildtyps identifiziert und mittels sekundärer Restriktion des eluierten Fragmentes kontrolliert (Tab. 2).

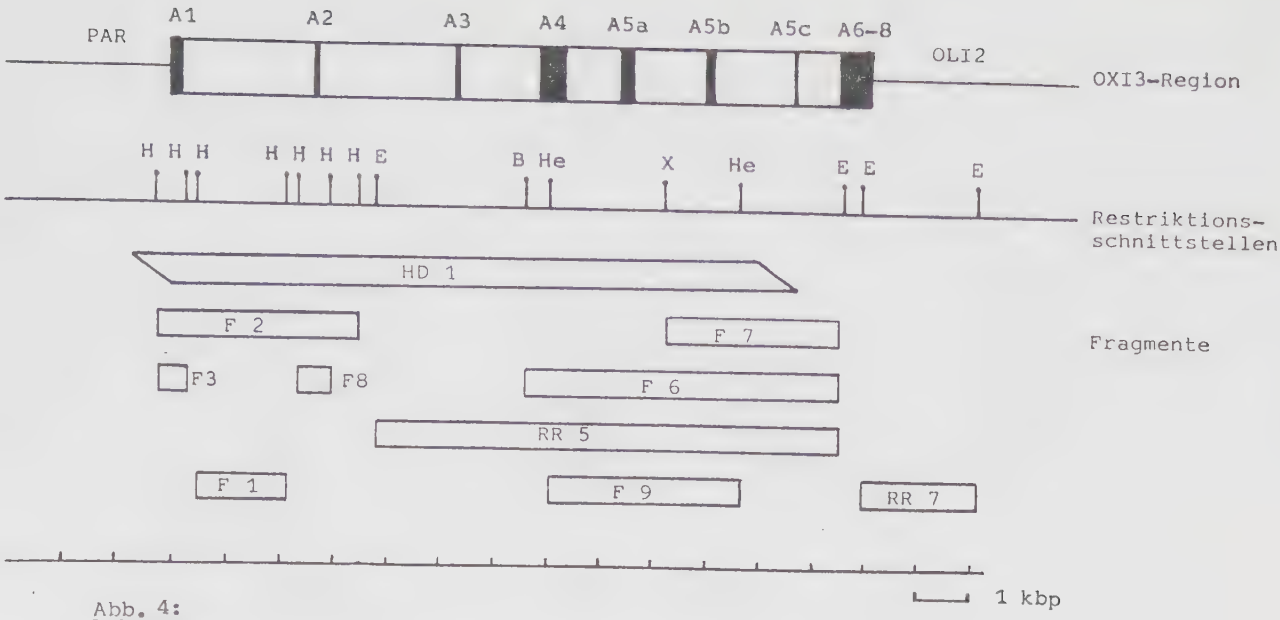


Abb. 4:

Darstellung der Lage und Ausdehnung der aus den rho⁻Klonen gewonnen Restriktionsfragmente des OXI3-Gens

Die Bezeichnungen entsprechen den in Tab. 2 angegebenen.

H = Hinf I; H = Hpa II; E = EcoR I; B = BamH I; He = Hae III;

Fragment	Bezeichnung	Enzym	Länge (bp)	isoliert aus:
F1	HI-HI	Hinf I	1580	rho$^-$ BM1 sub2 / HD1
F2	HII-HII	HpaII	ca. 3600	rho$^-$ BM1 sub2 / HD1
F3	HII-HI	HpaII/HinfI	ca. 430	rho$^-$ BM1 sub2 / HD1
F4	RR7	Eco RI	ca. 2200	rho$^-$ BM1
F5	RR5	Eco RI	ca. 8000	rho$^-$ BM1
F6	BI-R5	BamHI/EcoRI	ca. 5500	rho$^-$ BM1
F7	XI-R5	XhoI/EcoRI	ca. 3000	rho$^-$ BM1
F8	KI	HinfI/HpaII	ca. 700	rho$^-$ BM1 sub2
F9	KII	HaeIII	ca. 3200	rho$^-$ HD1
F10	JU	HinfI/HpaII	646	mit$^-$ DEL 3781

Tab. 2:

Liste der für die Hybridisierungen verwendeten Restriktionsfragmente.

2. Analyse der Transkripte von mit⁻-Punktmutanten der OXI3-Region

Das Primärtranskript des OXI3-Gens wird schrittweise zum reifen Messenger prozessiert. Um möglichst viele der dabei auftretenden Zwischenstufen der OXI3-Region zu erfassen und deren relative Konzentrationen zueinander sichtbar zu machen, wurde zunächst ein möglichst großes Fragment (Fragment F6) für die Hybridisierungen mit RNA aus Wildtyp und mit⁻-Punktmutanten verwendet. Im Wildtyp sollten auf diese Weise die mit der Northern-Blot Methode identifizierbaren Prozessierungsstufen festgestellt werden. In der mitochondrialen RNA der Punktmutanten sollten dann etwaige Transkriptgrößenänderungen gegenüber dem WT deutlich erkennbar werden. Die identifizierten Zwischenstufen des Processing wären dann auf ihre Zusammensetzung aus den verschiedenen Teilen der OXI3-Region zu untersuchen, wodurch schließlich Rückschlüsse auf den Reifungsverlauf des Messengers für die Untereinheit I der Cytochrom-c-Oxidase möglich werden. Da RNA-Moleküle der Größen 18S und 19S in dem verwendeten Gelsystem dicht beieinander laufen, wurde das Fragment F6 gewählt, welches mit dem Intron aI1 (19,2S) und dem Intron aI2 (19S) nicht hybridisiert (van Ommen et al. 1979 und Hensgens et al. 1983b).

Im Autoradiogramm der Wildtyp RNAs, welche mit OXI3-Proben hybridisieren (Abb. 5), sind ca. 30 RNA-Banden erkennbar. Unter ihnen sind je eine starke Bande einer 18S-RNA und 11S-RNA enthalten. Die 18S-RNA ist der reife Messenger und die 11S-RNA ist das aus dem Primärtranskript exzisierte und zirkularisierte Teiltranskript des Introns 5b (Hensgens et al. 1983b; Bonitz et al. 1980b). Darüber hinaus sind Banden von Teiltranskripten zu sehen, deren Größen bis in den Bereich von 42S reichen. Sie sind damit weit länger als

ein reines Transkript der OXI3-Region. Auch dies macht den komplexen Prozessierungsverlauf des Primärtranskriptes dieses Mitochondriengenomabschnittes deutlich.
Das Transkriptmuster der OXI3-Region des Wildtyps weist gegenüber dem der untersuchten mit⁻-Punktmutanten (Abb. 5 und Tabelle 3) keine erkennbaren Unterschiede auf. Auch bei diesen Mutanten sind die stärksten Signale die Banden für 18S-RNA und 11S-RNA. Daß in den hier untersuchten Punktmutanten die Prozessierung des Primär-Transkriptes bis zum reifen Messenger abläuft, ist außer am Erscheinen einer 18S-RNA auch an der Vielzahl fast gleichlaufender Banden von höhermolekularen Vorstufen zu erkennen. Sie reichen wie beim Wildtyp bis hinauf zu einer 42S-RNA. Es ist kein Hervortreten einer angehäuften Vorstufe zu erkennen, deren Prozessierungsgeschwindigkeit durch die Punktmutation vermindert worden wäre. Transkriptuntersuchungen an der COB-Region führten nur dann zu dem gleichen Befund, wenn Exon-Mutanten verwendet wurden (Schmelzer et al. 1981). Auch Transkripte der kodierenden Abschnitte der COB Region, für das Apocytochrom b, zeigten in diesem Fall ein vom Wildtyp nicht unterscheidbares Muster. Dies mag als Hinweis dafür dienen, daß es sich im Falle der hier untersuchten OXI3-Punktmutanten ebenfalls um Mutationen in den kodierenden Bereichen des Gens für die UEI der Cytochrom-C-Oxidase handelt. Da außerdem alle oben genannten Punktmutanten einen Ausfall des Cytochtom-Spektrums für aa3 zeigen (Bruckner 1984), scheint sich ihr Defekt auf der Ebene der Translation bzw. Assemblierung der Untereinheit I im Cytochrom-Oxidase Komplex auszuwirken. Darauf wird im folgenden Teil der Arbeit noch näher eingegangen.

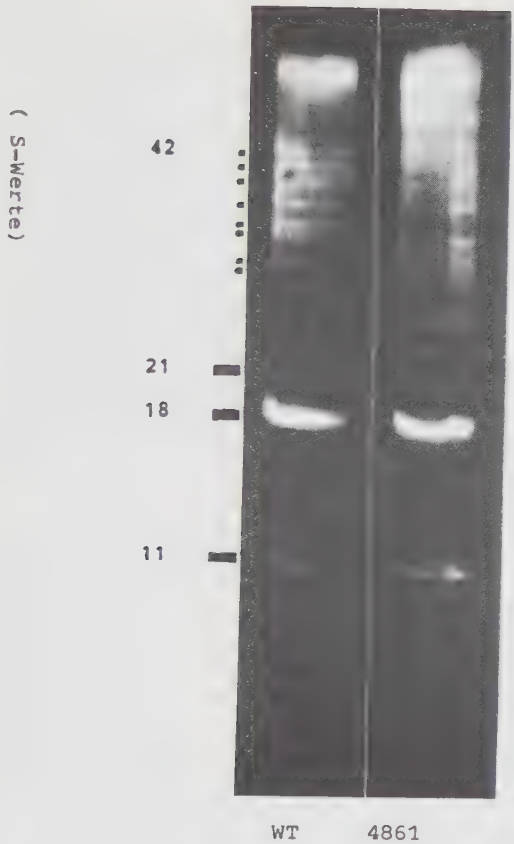


Abb. 5:
Transkripte des Wildtyps 777-3A und der OXI3-Punktmutante 4861.
Als ^{32}P-mtDNA Probe wurde das Fragment F6 verwendet.

2.1. Kontrollexperiment: Kreuzhybridisierungen

Bonitz et al. (1980b) beschreiben eine starke Sequenzhomologie zwischen Intron 1 COB und Intron 4 OXI3, welche für die errechnete Proteinsequenz ca. 70% beträgt. Aus diesem Grund wurde ein Kreuzhybridisierungstest (COB/OXI3) durchgeführt. Ein markiertes DNA-Fragment des Introns 1 COB wurde mit RNA des WT und einiger OXI3 Punktmutanten (4228/6351/4204/4346) hybridisiert. Am Autoradiogramm sind in allen Spuren nur die für COB Intron 1 typischen Banden 10S und 23S zu erkennen. Es findet sich aber kein Signal für RNAs, die auftreten, wenn ein DNA-Fragment verwendet wird, welches Intron 4 OXI3 enthält.

3. Transkriptuntersuchungen an Leaky-Mutanten

Eine weitere Möglichkeit Informationen über Prozessierungsstufen der Teiltranskripte der OXI3-Region zu erhalten, ist die Transkriptanalyse von Leaky-Mutanten dieser Region. Ein Hinweis dafür, daß diese Art von Mutanten zum Studium von Prozessierungsvorgängen geeignet sind, zeigten schon Untersuchungen am Mosaikgen COB (Schmelzer et a. 1981). Bei 35 % der COB-Intronmutanten handelt es sich um Leaky-Mutanten (Bechmann et al. 1981; Haid et al. 1979), die zu Prozessierungsdefekten unterschiedlichster Art führten, was dann Rückschlüsse auf die Reifung der Messenger-RNA zuließ.

3.1. Hybridisierung der mtRNA von OXI3 Leaky-Mutanten mit dem ^{32}P mtDNA-Fragment F6

Die RNA einer Auswahl von Leaky-Mutanten wurde mittels Northern-Blot Technik untersucht (siehe Abb. 6). Eine Kartierung der Mutanten lag zum Zeitpunkt der Transkriptuntersuchungen nicht vor. Alle untersuchten Leaky-Mutanten wiesen eine im Vergleich zum WT neuauftretende Bande für eine 23S-RNA auf. Bei der OXI3-Mutante 7351 war ein deutliches Signal einer 30S-RNA nachweisbar. Die Bande für die zirkuläre 11S-RNA ist in allen untersuchten Mutanten vorhanden. Auffallend ist die im Vergleich zum WT verminderte Menge an reifer 18S Messenger-RNA. Bei den Leaky-Mutanten ist die Reifung der RNA also erwartungsgemäß nicht vollständig gehemmt, sondern nur stark quantitativ vermindert. Es wird aber kein funktionsfähiges Polypeptid gebildet, wie der Ausfall des Cytochromspektrums für aa_3 zeigt (Bruckner 1984).

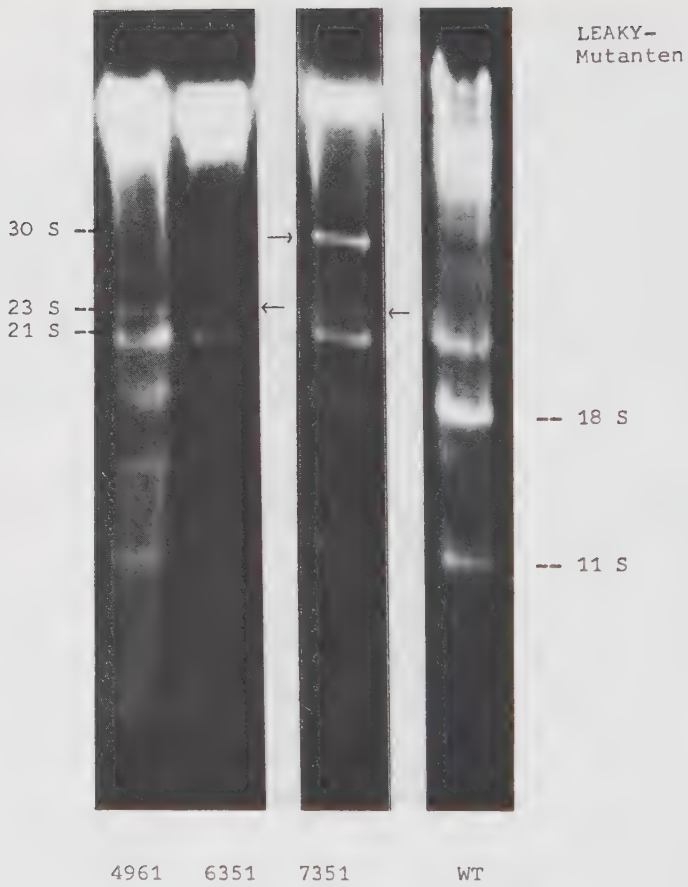


Abb. 6 : Transkripte von OXI3 Leaky-Mutanten nach Hybridisierung mit dem ^{32}P-markierten Fragment F6.

Die Anreicherung von 23S-RNA und 30S-RNA deutet darauf hin, daß es sich hierbei um definierte Stufen der OXI3-Prozessierung handelt. Diese Stufen entsprechen RNA-Längen von 3750 bzw. 5600 Nukleotiden. Die Transkriptstudien an der COB-Region hatten gezeigt, daß vor allem Mutationen innerhalb von Introns zu einer Anreicherung von RNA-Vorstufen führen (Schmelzer et al. 1981). Es darf daher angenommen werden, daß die Mutationsorte der untersuchten Leaky-Mutanten ebenso in Introns liegen und daß diese Intronsequenzen der OXI3-Region wesentlich für die Durchführung der Prozessierungsvorgänge sind.

Tabelle 3 :
Phänotypen der untersuchten mit $^{-}_{oxi3}$ Punktmutanten (Spalte 1-5 nach Bruckner 1984 verändert) und ihre am stärksten hervortretenden RNA Signale nach Hybridisierung mit dem ^{32}P markierten Restriktionsfragment F6.

Mutante	Temperatur-sensitivität	"leakiness"	Banden für Cytochrom aa_3 (Spektren)	cluster	am stärksten hervortretende RNA S - Werte
M 7171	(cs)	-	-	(1)	11 ; 18
M 2571	-	-	-	(3)	11 ; 18
M 7342	-	-	-	(4)	11 ; 18
M 6701	-	-	-	(7)	11 ; 18
M 6709	-	-	-	(7)	11 ; 18
M 4861	-	-	(+)	(9)	11 ; 18
M 1702	hs/cs	-	-	(11)	11 ; 18
M 4204	-	-	(+)	(16)	11 ; 18
M 7962	-	-	-	(17)	11 ; 18
M 2131	-	-	-	(18)	11 ; 18
M 4228	-	-	-	(19)	11 ; 18
M 4210	-	-	-	(21)	11 ; 18
M 4351	-	-	-	(25)	11 ; 18
M 6632	-	+	-	(3)	11 ; - ; 23
M 5010	hs	+	-	(8)	11 ; - ; 23
M 7351	hs	+	-	(21)	11 ; - ; 23 ; 30
M 2582	-	+	-	(23)	11 ; - ; 23
M 4961	hs	+	(+)	(23)	11 ; - ; 23
M 6351	hs	+	(+)	(23)	11 ; - ; 23

4. Proteinuntersuchungen an OXI3-Punktmutanten

Die vor einigen Jahren durchgeführten Proteinuntersuchungen am mitochondrialen Gen für das Apocytochrom b hatten wertvolle Hinweise auf die Mosaikgenstruktur dieses Mitochondriengenomabschnittes gebracht (Haid et al. 1979; Kreike et al. 1979; Bechmann et al. 1981). So konnten bei 48 von 134 untersuchten COB-Mutanten verkürzte Polypeptide nachgewiesen werden, die eine eindeutige Kolinearität zum Ort der Punktmutation im kodierenden Abschnitt dieses Gens zeigten.

Als Ergänzung der Transkriptuntersuchungen an den mit$^-$-Punktmutanten, die wie der Wildtyp eine 18S RNA zeigen, welche als der reife Messenger der Untereinheit I der Cytochrom-c-Oxidase angesehen wird (Bonitz et al. 1980b, Hensgens et al. 1983b), wurden daher Proteinuntersuchungen an einigen dieser Mutanten durchgeführt. Dabei sollte die Frage geklärt werden, ob dieser 18S-RNA noch irgendein nachweisbares Polypeptid entspricht.

Für die Untersuchung der Translationsprodukte von OXI3-Mutanten kam eine von Douglas und Butow 1976 beschriebene Methode zur Anwendung. Die in den Mitochondrien synthetisierten Proteine wurden unter Einwirkung von Cycloheximid, einem Hemmstoff der cytoplasmatischen Proteinsynthese, mit radioaktivem Sulfat $^{35}SO_4^{2-}$ markiert. Die Auftrennung der markierten Proteine erfolgte gemäß ihrem Molekulargewicht mittels SDS-Acrylamid-Gelelektrophorese. Die Ergebnisse sind in Abb. 7 und 8 dargestellt.

In Spur 1 der gezeigten Gele sind die Polypeptide des Wildtyps 777-3A aufgetrennt. Es findet sich dort eine Bande für die Untereinheit III der Cytochrom-c-Oxidase

(MW 23'000; Schatz u. Mason 1974; Douglas u. Butow 1976; Kreike et al. 1979), je eine solche für Cytochrom b und die Untereinheit II der Cytochrom-c-Oxidase (OXI1). Die etwas diffus laufende Bande ist diejenige der Untereinheit I der Cytochrom-c-Oxidase (MW 40'000), auf die ja das Hauptaugenmerk der hier dargestellten Untersuchungen gerichtet war. Darüber schließlich liegt die VAR-Bande. Alle oben aufgeführten OXI3-Mutanten waren auch schon für die Transkriptuntersuchungen verwendet worden. Sie kartieren in den Clustern 3/7/11/17/19 und 21 (Bruckner 1984). Diesen Mutanten fehlt die Bande für die Untereinheit I der Cytochrom-c-Oxidase, ohne daß statt ihrer ein neues Signal erscheint, und zwar auch dann, wenn die Markierungszeiten für die mitochondrialen Proteine verlängert worden waren (15; 30; 45 Min.).

Die parallel dazu durchgeführten Transkriptstudien hatten aber eine Bande für den reifen Messenger gezeigt. Dieses Ergebnis läßt einen Vergleich mit einer Reihe von Untersuchungen anderer Gruppen unter ähnlichen Bedingungen (Slonimski u. Tzagoloff 1976; Netter et al. 1982) zu. Netter et al. (1982) klassifizierte die OXI3-Mutanten in drei Gruppen, nämlich Mutanten die ein Produkt mit 40'000 D (UE I) aufweisen, aber in der spektralen Untersuchung aa_3-negativ sind. Diese werden von ihm als missense-Mutanten der Exons der OXI3-Region bezeichnet. Einige wenige Mutanten weisen ein Polypeptid der Größe von 56'000 D auf und werden von Netter et al. (1982) als Intronmutanten aufgefaßt, da dieses Produkt offenbar durch Ablesen der ersten vier Exons und eines Teils der Introns 4 zustande kommt. Zur dritten und größten Gruppe gehören die oben beschriebenen Mutanten, welche kein nachweisbares OXI3 spezifisches Polypeptid besitzen.

Abb. 7:
Mitochondriale Translationsprodukte
von OXI3 Punktmutanten im Vergleich mit dem Wildtyp.
(Markierungszeit 15 Minuten)

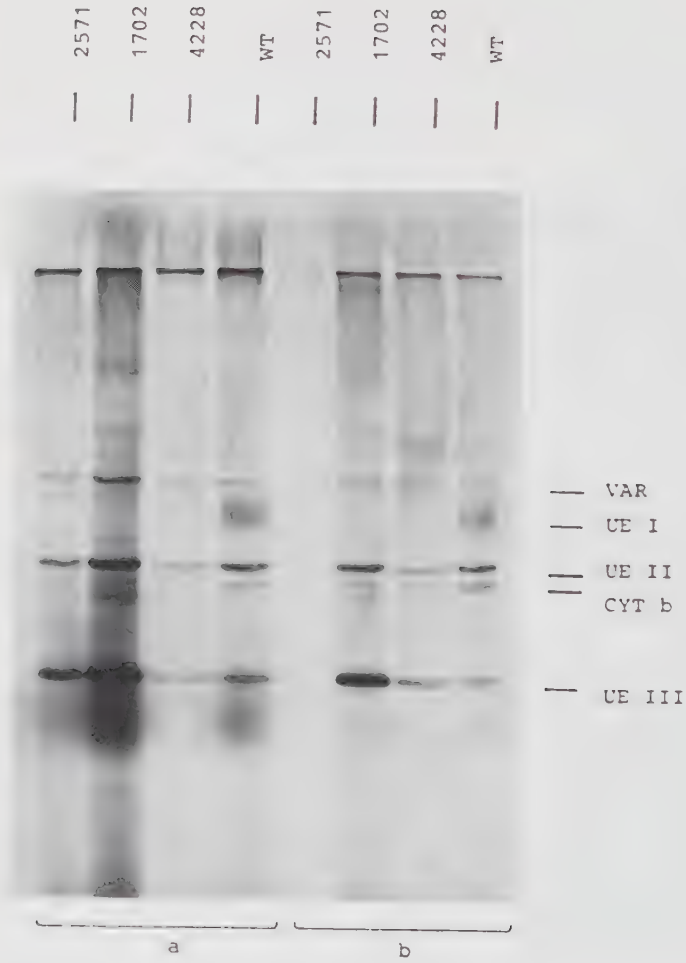


Abb. 8:

Mitochondriale Translationsprodukte von

OXI3- Punktmutanten

Markierungszeit : a) 15 bzw. b) 45 Minuten

Die Transkriptstudien in der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, daß die Prozessierung der hier untersuchten Mutanten zum reifen Messenger noch funktioniert. Das völlige Verschwinden des veränderten Produktes kann wohl auf den Abbau des nichtintegrierten Polypeptids zurückgeführt werden. Daß der Einbau einer strukturell veränderten Untereinheit I in den Cytochrom-c-Oxidase Komplex im Vergleich mit anderen Untereinheiten erheblich erschwert sein könnte, ist vorstellbar, da die UE I das größte Molekulargewicht aufweist und ihr eine zentrale Lage im Komplex zukommt (siehe Abb. 9). Zusammenfassend kann man sagen, daß es sich bei den hier untersuchten OXI3-Punktmutanten mit hoher Wahrscheinlichkeit um Assemblierungsdefektmutanten aus kodierenden Teilen (Exons) des Gens für die Untereinheit I der Cytochrom-c-Oxidase handelt.

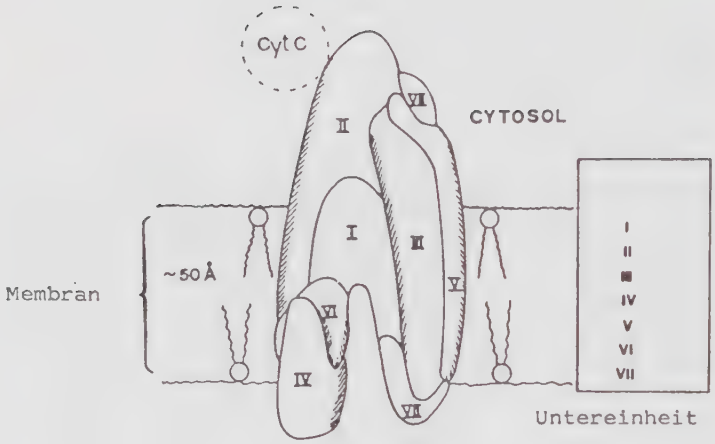


Abb. 9:
Modell der Zusammensetzung einer Cytochrom-c-Oxidase (nach Brunori et al., 1982; verändert).
Eines der Monomere des Cytochrom-Oxidase-Dimers ist abgebildet. Die Untereinheit I nimmt in diesem Komplex eine zentrale Lage ein. Die Untereinheit I, II und III sind mitochondrial kodiert.

5. Einwirkungen von Chloramphenicol auf die Reifung der OXI3-Messenger RNA

Es gibt eine Reihe von Hinweisen dafür, daß mehrere Faktoren (unabhängig oder zusammenwirkend) am Processing der Messenger-RNA der Mitochondrien beteiligt sind. So bestehen z.B. offene Leserahmen in den OXI3-Introns (Bonitz 1980) und in COB Introns (Jacq et al. 1980, Nobrega u. Tzagoloff 1980). Außerdem wurde der Beweis erbracht, daß bestimmte Defekte in Kernproteinen spezifisch das Splicing der OXI3-Region beeinflussen (Faye und Simon 1983).

Als weiteren Aspekt der Untersuchung des Splicings wurde daher die Wirkung der Hemmung mitochondrialer Proteinsynthese durch CAP auf das Processing der OXI3-Transkripte untersucht. Eigenschaft des CAP ist es, spezifisch die mitochondriale Translation zu blockieren, während die zytoplasmatische Proteinsynthese ungehindert weiterläuft. So reagiert das CAP nur mit den mitochondrialen 70S-, aber nicht mit den cytoplasmatischen 80S-Ribosomen. Dabei bindet es an die 50S-Untereinheiten der Ribosomen und bewirkt vermutlich eine Hemmung der Peptidverknüpfungsreaktion (Grivell et al. 1971). Die Wirkung von CAP auf den Ablauf der Messenger-RNA-Reifung kann somit Hinweise darauf ergeben, ob für die Prozessierungsvorgänge der OXI3-Region mitochondriale Translation nötig ist. Ihr Ausfall sollte dann zu einer Anhäufung von mRNA-Vorstufen führen.

Es wurde RNA von Chloramphenicol-behandelten Zellen des Wildtyps 777-3A mit ^{32}P mtDNA der OXI3-Region hybridisiert. Die Zellen waren zu unterschiedlichen Zeiten während der Wachstumsphase mit CAP (4 mg/ml) behandelt und bei einem

Titer von ca. 5 x 10^7 geerntet worden (Schmelzer et al. 1982). Als Hybridisierungsprobe wurde ein OXI3 Hpa II-Fragment (3'600 basepairs) verwendet, das die beiden ersten Exons und Introns der OXI3-Region erfaßt. Auf Abb. 10 (S.43) kann man sehen, daß die Behinderung der mitochondrialen Translation zu einer Verschiebung der Konzentration der Transkripte in Richtung der höheren S-Werte führt, was eine Verzögerung der Reifung der Messenger-RNA bedeutet. Das Ausmaß der Hemmung hängt von der Einwirkungsdauer von CAP gemessen in Zellgenerationen ab. Bei einer Einwirkungszeit von einer Zellgeneration (Abb. 10) ist noch keine deutliche Hemmung zu sehen. Ist die Einwirkungszeit 3 Zellgenerationen, so finden sich starke Signale für 30S, 34,5S, 38S, 40S, dahingegen abgeschwächte Bande für 19S. Bei einer Einwirkungszeit von 5 Zellgenerationen wird die Abnahme der 18S und 19S-RNA immer deutlicher. Auch dieser Versuch zeigt, daß das OXI3-Processing über definierte Stufen zum reifen Messenger abläuft. Es handelt sich also nicht um ein statistisches Zerlegen des Primär-Transkriptes. Außerdem unterscheidet sich beim Wildtyp KL14-4A, der gegen CAP resistent ist, das Transkriptmuster unter CAP-Behandlung fast überhaupt nicht von dem unter normalen Wachstumsbedingungen (Schmelzer et al. 1982). CAP hat also die Veränderungen beim Wildtyp 777-3A nicht durch unspezifische Effekte hervorgerufen. Besonders deutlich hervortretende Prozessierungsstufen der OXI3-Region sind die 30S, 34,5S, 38S und 40S. Die 30S-RNA war auch schon bei den Leaky-Mutanten nachgewiesen worden. Dieser Wert entspricht einem Molekulargewicht von etwa 5000-6000 bp, also etwa der Hälfte der OXI3-Region. Das Mengenverhältnis von 19,2S zu 18/19S bleibt stets annähernd gleich, unterliegt also offensichtlich gleichen Prozessierungsbedingungen.

Abb.10: Einfluß von Chloramphenicol auf die Reifung von OXI3-Transkripten.

Das Foto zeigt eine Autoradiografie der mit ^{32}P-OXI3-mtDNA hybridisierten mtRNA des Wildtyps 777-3A.
Die Spuren 0 bis 8 enthalten RNA der mit CAP behandelten Zellen. Die Zahlen entsprechen den behandelten Zellgenerationen
K = unbehandelte RNA einer COB-Mutante.
8' = CAP wurde 7Std. vor der Ernte der Zellen entfernt.
Die geblottete RNA wurde von Dr. Schmelzer zur Verfügung gestellt.

Die Blockierung des 'Processing' ist reversibel. In Spur 8' der Abb. 10 ist RNA von Zellen aufgetragen, aus denen das Chloramphenicol 7 Std. vor der Ernte wieder entfernt wurde. Es sind wieder Banden für 19,2S, 18S und 19S erkennbar.

5.1. Vergleich mit COB

Vergleicht man die S-Werte der Pre-Messenger-RNA von OXI3 mit denen in dem unter gleichen Bedingungen geführten Versuch für die COB-Region, so sind keine gemeinsamen Größenordnungen von Prozessierungsstufen feststellbar. COB und OXI3 bilden offenbar keine gemeinsamen Vorstufen auf der Ebene der RNA. Alle RNA-Stufen der OXI3-Region, die mit der verwendeten ^{32}P-Hybridisierungsprobe erfaßbar sind, wurden durch CAP-Einwirkung in ihren Mengenverhältnissen beeinflußt, wohingegen die 10S-RNA der COB-Region unbeeinflußt prozessiert wird (Schmelzer et al. 1982). Die 11S der OXI3-Region wird im folgenden erst im Zusammenhang mit den Untersuchungen der Deletionsmutanten dahingehend überprüft, ob sie von mitochondrialen Proteinen unabhängig exzisiert wird.

5.2. Überlängen

Ein weiterer interessanter Aspekt des CAP-Experiments ist das starke Hervortreten von Prozessierungsstufen, die in ihren Gesamtlängen über die Länge der OXI3-Region hinausgehen. Transkripte im 42S Bereich waren auch schon bei den Punktmutanten zu beobachten. Das kann bedeuten, daß das Gen für die UEI der Cytochrom-c-Oxidase mit anderen Genomabschnitten der Mitochondrien-DNA gemeinsam transkribiert wird. Dafür in Frage kommende Abschnitte sind die OLI2 und die PAR-Region. Allerdings sind präzise Aussagen über Transkriptlängen höher als 32S schwer möglich, da die Längen dieser Vorstufen nur noch annähernd bestimmt werden können. Aus den Sequenzdaten von Bonitz et al. (1980) und Hensgens

et al. (1983b) läßt sich erschließen, daß die längste Pre-mRNA der OXI3-Region des "langen" Stammes ca. 13'500 Basen lang sein müßte. Die Signale für die längsten erkennbaren Transkripte, die mit OXI3 DNA-Proben hybridisieren, sind aber schätzungsweise 20 kb lang. Das heißt, daß das primäre Transkript dieses Gens weit vor dem eigentlichen Initiationskodon oder nach dem eigentlichen Terminationskodon beginnen oder enden muß. Van Ommen et al. (1979) beobachteten solche überlangen Transkripte, wenn sie zur Hybridisierung OXI3-Proben bzw. Proben der benachbarten OLI2-Region benutzten. Diese beiden Gene werden vom selben DNA-Strang transkribiert (Macino u. Tzagoloff 1980). Faye und Simon (1983) beschreiben ebensolche Überlängen beim kurzen Stamm D 273-10B in der Größenordnung von 16'000 bis 17'000 Basen, wobei die OXI3-Region dieses Stammes mit ca. 10'000 Basen angegeben wird (Bonitz et al. 1980b). Eine mögliche Schlußfolgerung daraus ist, daß das OXI3-Gen und das OLI2-Gen eine gemeinsame Precursor-RNA bilden, welche dann einem getrennten Processing zum jeweiligen eigentlichen Messenger unterworden wird, wohingegen keine gemeinsamen Vorstufen mit COB gebildet werden.

5.3. Proteinwirkung

Ein wichtiges Ergebnis der dargestellten Untersuchungen ist, daß die Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese mit CAP zu einer deutlichen Blockierung des Processing der Messenger-RNAs führt. Das bedeutet, daß die Reifung der OXI3 Messenger-RNA offenbar von der mitochondrialen Translation abhängt, was mit den Ergebnissen der CAP-Untersuchungen am Mosaikgen COB in Einklang steht (Schmelzer et al. 1982). Diese Beobachtungen bestätigen die schon länger bekannten Hinweise dafür, daß mitochondriale Proteine am Splicing der mt-Messenger-RNA-Vorstufen beteiligt sind

(Reviews: Lewin 1980; Grivell u. Borst 1982 und OXI3 betreffend Hensgens et al. 1983b). So wird beim Mosaikgen COB das Spleißen des zweiten Introns durch ein Protein, eine sogenannte bI2-Maturase, vermittelt, das zu einem großen Teil von einem Abschnitt des Introns selbst kodiert wird (Jacq et al. 1980; Lazowska et al. 1980). In den ersten vier Introns der OXI3-Region findet man ebenfalls lange Leseraster, die darauf hindeuten, daß intronspezifische Maturasen an der Weiterbearbeitung der RNA beteiligt sind.

6. Transkriptuntersuchungen an OXI3-Deletionsmutanten

In den vorangegangenen Kapiteln waren Untersuchungen dargestellt worden, welche der Aufklärung der Prozessierung der Transkriptzwischenstufen des Primärtranskriptes der OXI3-Region mit Hilfe verschiedenartiger Punktmutanten oder unter Chloramphenicoleinwirkung zum Thema hatten. Es wurde der äußerst komplexe Verlauf der Reifung der Messenger-RNA dieser Region deutlich. Die Verwendung von mit$^-$ - Deletionsmutanten, die große Teile des hier untersuchten Gens verloren haben, erlaubt die gesonderte Betrachtung des Processing einer verminderten Zahl von Exons und Introns. Die Untersuchung dieser Art von Mutanten sollte Antwort auf die Frage geben, ob durch das Fehlen des zentralen Teils der OXI3-Region in den hier verwendeten Mutanten des "langen" Stammes 777-3A überhaupt noch ein RNA-Processing stattfinden kann und wenn ja, wie dieses ablaufen würde.

Von H. Bruckner (1984) wurden 231 OXI3-Mutanten auf die Art ihrer Mutation genetisch geprüft. Durch Kreuzungsanalysen konnte festgestellt werden, daß davon 43 Stämme (= 20 %) Deletionen tragen. Von den Mutanten des OXI1-Gens weisen nur 3 % und von den Mutanten der COB-Region lediglich 1,5 % aller isolierten Mutanten Deletionen auf. Im OXI3-Gen finden also mit besonderer Häufigkeit DNA-Verluste statt. Die innerhalb der OXI3-Region liegenden Enden des deletierten Abschnittes treten gehäuft an definierten Stellen des Gens auf. Etwa 45 % aller induzierten OXI3-Deletionen enden zwischen den Clustern C18 und C19 (Bruckner 1984). Weitere derartige Endpunkte liegen zwischen den Clustern C24/C25 (10 %), C22/C23 (7,5 %) und C7/C8 (6,5 %) (siehe Abb. 11). Da alle diese Mutanten aus voneinander unabhängigen Induktionsansätzen stammen, handelt es sich

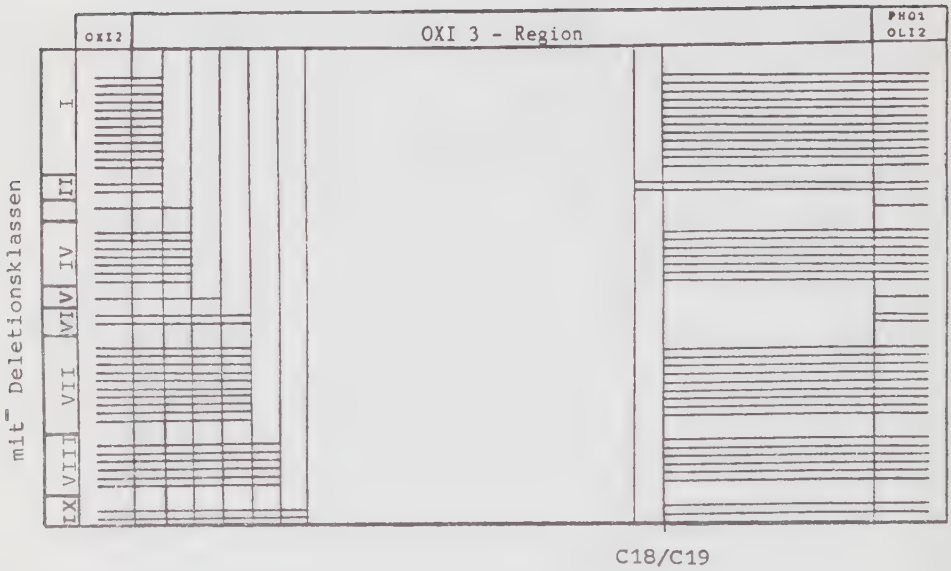


Abb. 11: Darstellung der mit⁻-Deletionsklassen I bis IX. Die horizontalen Linien bezeichnen die zurückbehaltenen mtDNA-Bereiche. Nach Bruckner (1984); verändert. Weitere Erläuterungen finden sich im Text auf Seite 47 und in Abb.12 .

bei den vier genannten Genbereichen offenbar um sogenannte "Hot Spots" der Deletionsentstehung (siehe Abb.11).

Die genetische Kartierung wurde durch eine physische Lokalisation der Deletionsendpunkte mittels Restriktionskartierung ergänzt. Dabei konnte auf bereits vorhandene Ergebnisse der Arbeitsgruppe Kaudewitz zurückgegriffen werden. Mit zwei Restriktionsenzymen war eine vorläufige Kartierung der Deletionsmutanten durchgeführt worden. Außerdem waren an einer großen Zahl dieser Mutanten die Längen der sogenannten Junctions bestimmt worden. Ein Junction einer Deletionsmutante ist ein Fusionsprodukt aus DNA-Abschnitten vor und nach dem deletierten Bereich. Die Größe eines Junction-Fragments wird durch das jeweilige verwendete Restriktionsenzym bestimmt. Im Restriktionsbandenmuster ist dieses Fragment erkennbar als eine im Vergleich mit dem Wildtyp neu auftretende Bande.

Ein derartiges Junction kann eindeutig nachgewiesen werden, wenn ein ^{32}P-markiertes Restriktionsfragment aus dem Wildtyp, das an der Grenze zum deletierten Bereich liegt, gegen das restringierte Genom einer Deletionsmutante nach Southern (1975) hybridisiert wird. Auf diese Weise waren die Fusionsfragmente von mehr als 30 verschiedenen Deletionsmutanten festgelegt worden. Auffallend daran ist das gruppenweise Auftreten von Junctions gleicher Größenordnung trotz voneinander unabhängiger Mutagenese der Mutanten. Aufgrund dieser Daten konnten die Deletionsgruppen in drei übergeordnete Klassen eingeteilt werden (Abb.12).
Hierbei handelt es sich um Gruppe A mit 10,4 kb, ferner Gruppe B mit 7,8 kb und Gruppe C mit 9,3 kb deletiertem Bereich ($\pm$ 100 bp). Dabei lassen sich in allen untersuchten Mutanten lediglich vier Endpunkte der Deletionen feststellen. Diese Punkte liegen in eng begrenzten Sequenzabschnitten

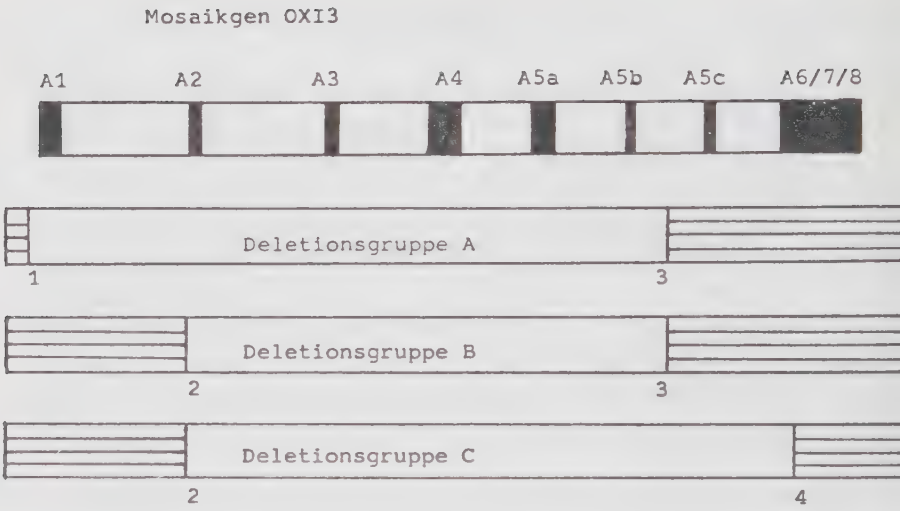


Abb. 12:
Ausdehnung und Lage der Deletionsgruppen A/B/C im Mosaikgen OXI3. Die Zahlen 1/2/3/4 bezeichnen die Deletionsendpunkte der Deletionsmutanten.
Die retenierten Genomabschnitte sind schraffiert gezeichnet.

kurz vor Exon A1 (= 1.), kurz vor oder in Exon A2 (= 2.), ferner im mittleren Teil von Intron AI5b (= 3.) und in oder nach Exon A6 (= 4.). Auch diese Befunde bestärkten den Verdacht, daß die Endpunkte der Deletionen gruppenweise an jeweils identischer Stelle (site specific) oder zumindest an einer sehr ähnlichen Stelle des Genoms liegen (hot spot). Die geschilderten Kartierungen wurden an einer Reihe exemplarisch ausgesuchter Mutanten ergänzt und erweitert, was im letzten Teil der vorliegenden Arbeit dargestellt wird. Zu Beginn der Transkriptstudien war also die ungefähre physische Ausdehnung (± 100 bp) der Deletionen bekannt. Diese Ergebnisse bildeten die Grundlage für die Auswahl von Mutantenstämmen, welche für die folgenden Prozessierungsanalysen Verwendung finden sollten.

Aufgrund der Tatsache, daß es sich um nur drei übergeordnete Gruppen von Deletionsmutanten handelte, genügte es, eine repräsentative Auswahl von Stämmen innerhalb dieser Einteilung zu untersuchen. Ziel der Auswahl war es, eine Reihe von Mutanten zu analysieren, die Intron 1 möglichst komplett zurückbehalten hatten, während eine andere Serie dieses verloren haben sollte. Dazu wurden Mutanten aus den Gruppen A und B gewählt, da hier die größte Anzahl von Stämmen zu finden war. Basis der Auslese innerhalb dieser übergeordneten Gruppen bildete die bereits vorliegende genetische Kartierung (Bruckner 1984). Diese hatte auf der linken und rechten Seite des deletierten Bereichs eine feine Differenzierung der Deletionsendpunkte ergeben. Deshalb wurden mehrere Mutanten aus den Klassen VII, VIII und IX verwendet, so daß ein nach links abgestufter retenierter Bereich um A2 untersucht werden konnte. Außerdem wurden Mutanten der Klassen I und II mit Endpunkt vor A1 getestet. Ergänzende Transkriptanalysen erfolgten stichpunktartig an einzelnen Mutanten der Klassen IV, V und VI.

Für die nun folgenden Hybridisierungsanalysen wurden vor allem DNA-Fragmente aus den dafür induzierten rho$^-$ - Stämmen, aber auch aus den Deletionsmutanten selbst verwendet. Damit sollte eine Differenzierung der Herkunft von Teiltranskripten aus verschiedenen Abschnitten des OXI3-Gens bei den eingesetzten Mutanten erreicht werden. Die Lage aller für diese Transkriptstudien verwendeten ^{32}P-markierten mtDNA-Fragmente ist in Abbildung 13 zusammengefaßt. Weiterführende Erläuterungen finden sich bei der Beschreibung der Durchführung der Northern Blots unter Verwendung dieser Proben.

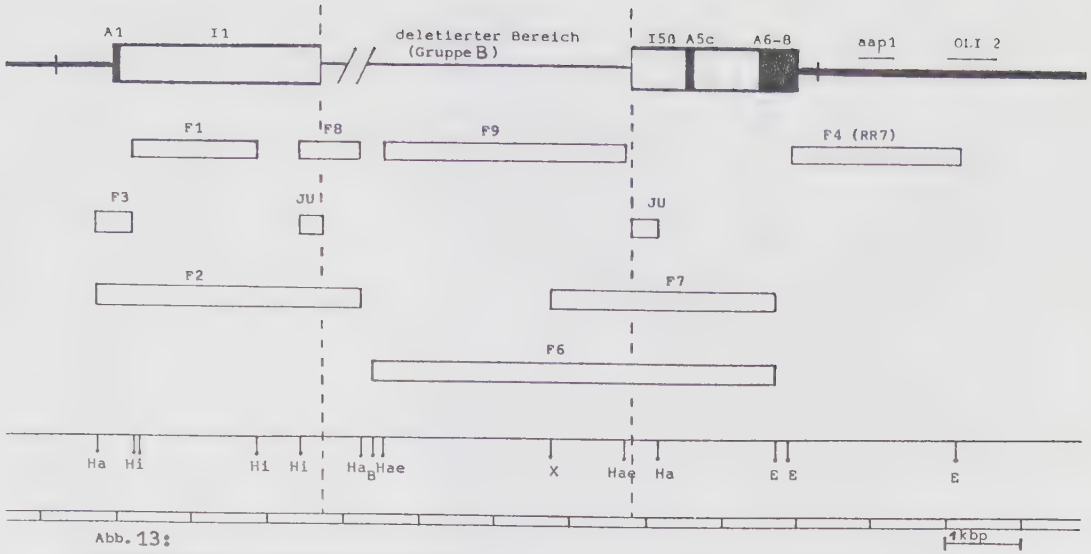


Abb. 13:

Lage der für die Northernblot-Hybridisierungen verwendeten Restriktionsfragmente.

Ha = HpaII; Hi = Hinf I; E = EcoRI; B = Bam HI; X = XhoI;

(oben dargestellt sind die zurückbehaltenen Abschnitte des OXI3-Gens der Deletionsmutanten der Gruppe B).

6.1. Hybridisierungen mit dem Fragment F7

Die Hybridisierung mit einem großen Fragment aus dem in 3'-Richtung liegenden Abschnitt der OXI3-Region (Abb.13) sollte einen Überblick darüber bringen, ob von den Deletionsmutanten noch Teil-Transkripte dieser Region gebildet werden. Das dazu verwendete DNA-Fragment F7 überspannt teilweise Exon A6-8, ferner Intron a5c, Exon A5c und das Restintron a5b bis in den bei den Mutanten deletierten Bereich hinein (Abb.13). Das am Autoradiogramm sichtbare Bandenmuster (Abb.14) war dann auch sehr vielfältig. Wie im Wildtyp wird eine 11S-RNA gebildet. Bei den Deletionsmutanten der Gruppe A kommt eine 13,5S-RNA und bei den Deletionsmutanten der Gruppe B kommt eine 16,5S-RNA hinzu. Ferner ist für Gruppe B eine 20S-RNA Spezies charakteristisch. Im 18S-Bereich zeigen beide Mutantenklassen jeweils ein Transkript, das nur geringfügige Laufunterschiede gegenüber dem reifen Messenger des Wildtyps aufweist und das im folgenden als 18S A RNA bzw. 18S B RNA gemäß der Gruppenzugehörigkeit bezeichnet wird.

Im höhermolekularen Bereich tritt bei den Deletionsmutanten der Klasse B eine 29S-RNA Spezies auf, die sich bei den Mutanten der Klasse A nicht findet. Bei Hybridisierungen mit dem Fragment F7 zeigen sich auch schwache Signale für die 22S- und 24S-Transkripte von OLI2 (Abb.14), da dieses Fragment aus einem rho$^-$-Klon herausgeschnitten wurde, der unter anderem auch das OLI2-Gen enthält,und somit Reste dieser Sequenz in geringem Ausmaß mithybridisierten. Erwähnenswert ist ferner das Auftreten (Abb.14) eines schwachen Signals für eine 26S-RNA, die bei den Mutanten 3781 und 2613 etwas deutlicher hervortritt, was offenbar auf günstigere Laufbedingungen im Gelsystem zurückzuführen ist. Eine Zusammenstellung der beobachteten Transkripte findet sich in der Tabelle auf Seite 68.

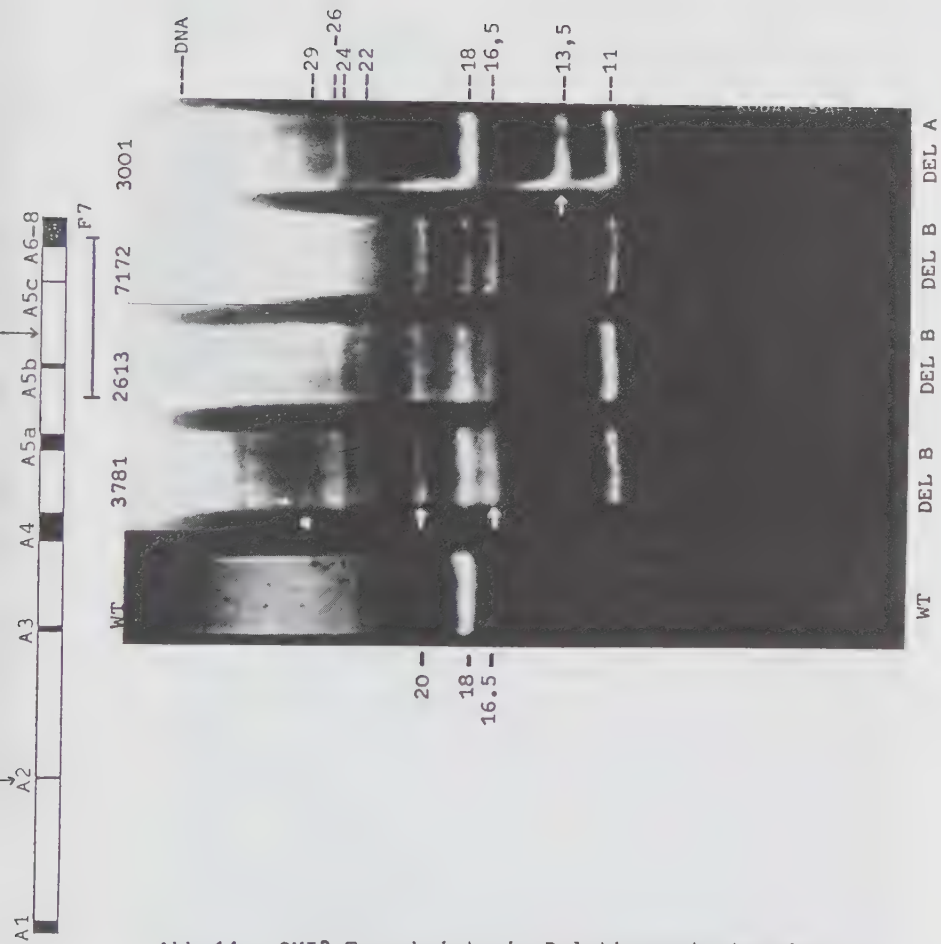


Abb.14 : OXI3-Transkripte in Deletionsmutanten der Gruppen A und B nach Hybridisierung mit dem Fragment F7. (DEL B = Gruppe B ; DEL A = Gruppe A).

6.2. Hybridisierungen mit dem Fragment F4

Parallel dazu wurde die Mutante 3001 (Gruppe A) mit einem Eco RI-Fragment (F4) hybridisiert, welches von Exon A6-8 ausgehend bis in die OLI2-Region verläuft (Abb.13). Damit sollte der 3'-Anteil der OXI3-Region in den Transkripten und die charakteristischen Banden für das OLI2-Gen erfaßt werden. Erwartungsgemäß erschienen zwei für die OLI2-Region typische (Van Ommen et al. 1979; Hensgens et al. 1983) Transkriptbanden mit sehr hohem Schwärzungsgrad im Bereich von 22S und 24S (Abb. 15). Das starke Hervortreten dieser beiden Banden ergibt sich daraus, daß das zur Hybridisierung verwendete Fragment F4 eine wesentlich höhere Anzahl von Basenpaarungen mit der OLI2-RNA ermöglicht (ca. 700 N) als mit dem 3'-Ende der OXI3-Region (ca. 100 N Osinga et al. 1984b).

Bei der Deletionsmutante 3001 sind Signale für eine 13,5S-RNA und eine 18S-RNA zu sehen, welche auch schon mit dem Fragment F7 beobachtet worden waren.

6.3. Hybridisierungen mit den Fragmenten RR5 und RR7 (=F4)

Zusätzlich zu den vorgenannten Experimenten wurden weitere Transkriptuntersuchungen an Deletionsmutanten der Klasse A und B in Form von Northern Blots unter Verwendung von DNA-Fragmenten aus dem Wildtyp durchgeführt. Hierzu wurde außer dem schon oben genannten Fragment RR7 (Abb. 13) ein Eco RI Fragment verwendet, das ca. 8000 bp der OXI3-Region beinhaltet. Durch Nachschneiden mit dem Enzym Bam HI (siehe F6 auf Abb. 13) wurde eine weitgehende "Reinigung" von Restsequenzen aus anderen Regionen des Mitochondriengenoms erreicht. Wegen des unverhältnismäßig hohen Anteils an ribosomaler RNA in der RNA-Gesamtmenge führen bereits geringe DNA-Kontaminationen aus den für die 21S-rRNA und

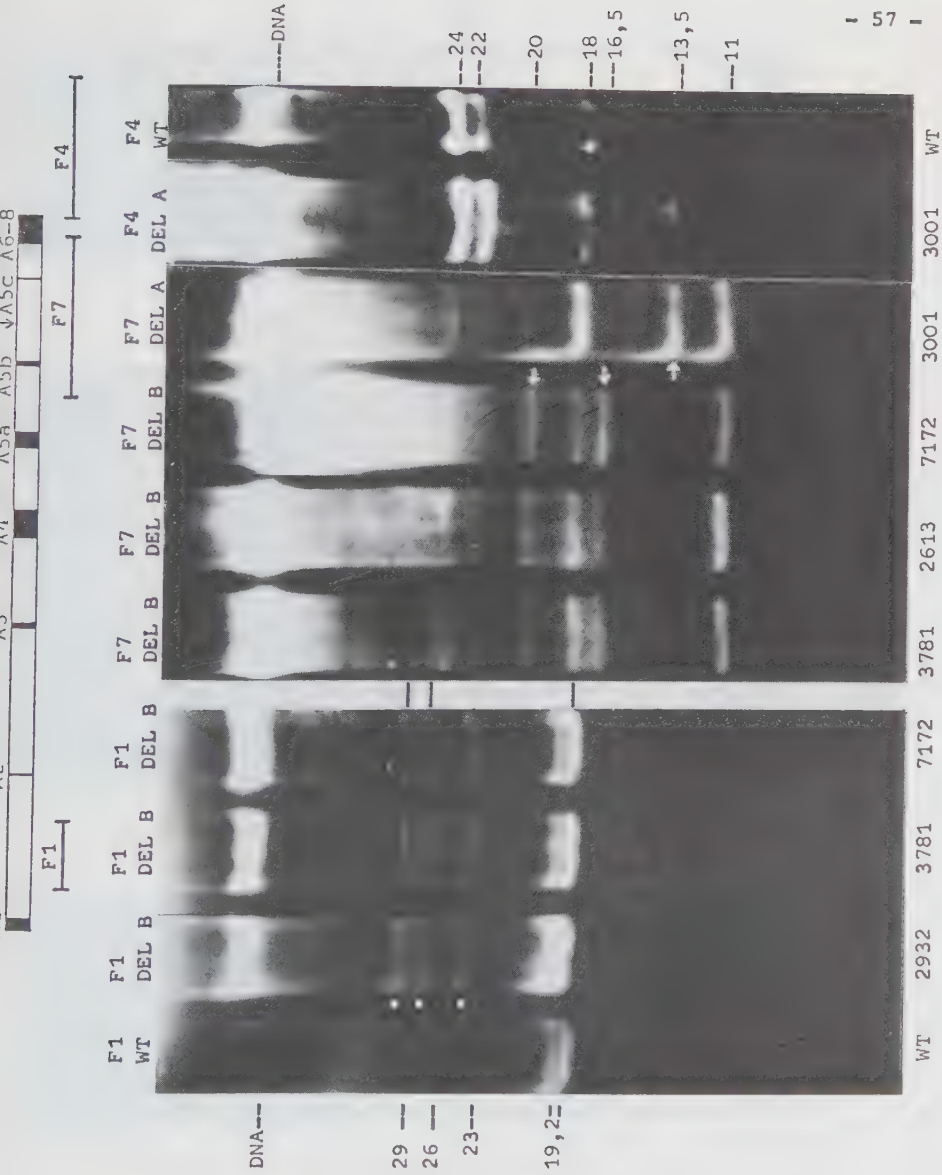


Abb.15 Transkripte der OXI3-Deletionsmutanten nach Hybridisierung mit den DNA-Fragmenten F1, F7 und F4.

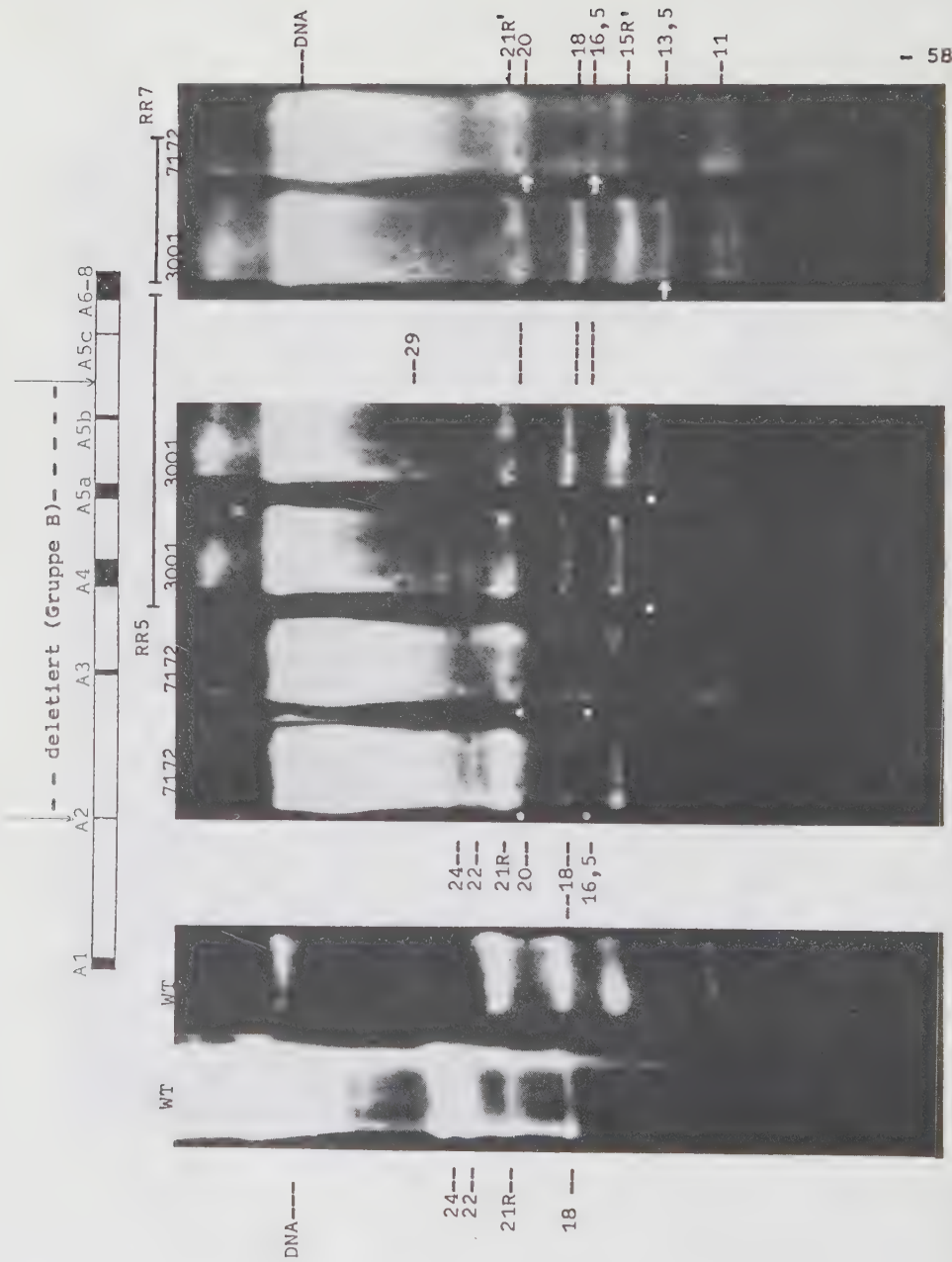


Abb 16 :Transkripte der OXI3-Deletionsmutanten nach Hybridisierung mit den DNA-Fragmenten RR5 und RR7. (R' = ribosomal)

15S-rRNA kodierenden Abschnitten des Genoms zu zwei deutlich sichtbaren Banden auf den Autoradiogrammen der Northern Blot Hybridisierungen. Dieser Umstand läßt sich zur exakten Molekulargewichtsbestimmung der übrigen auftretenden Banden direkt auf dem Autoradiogramm nutzen.(Abb. 16; Seite 58). Auch bei den hier untersuchten Mutanten treten die schon oben beschriebenen charakteristischen Transkriptgrößenordnungen auf, und zwar entsprechend der Zugehörigkeit der Mutanten zu den genetisch und mittels Restriktionskartierung bestimmten Gruppen A oder B.

A : 13,5S und $18S^A$

B : 16,5S ; $18S^B$; 20S und 29S.

Die 11S-RNA, die dem Intron aI5c entspricht, findet sich in allen hier untersuchten Mutanten.

6.4. Hybridisierungen mit dem Fragment F1 (Intron aI1)

Aufschlußreich war auch eine Untersuchung der Transkripte der Deletionsmutanten durch Hybridisierung ihrer RNA mit einer ^{32}P-markierten DNA-Probe, die spezifisch für das Intron aI1 ist. Nachdem die den Hybridisierungen vorausgegangenen Restriktionsanalysen Hinweise dafür gebracht hatten, daß das Deletionsereignis unmittelbar am Ende des Intron 1 stattgefunden haben muß, sollte untersucht werden, ob die Exzision dieses Introns noch möglich ist, obwohl im Anschluß daran der größte Teil der OXI3-Region fehlt.

Zur Klärung dieser Frage wurden die Transkripte einer Reihe von Mutanten der Deletionsklasse B analysiert (siehe Abb.17). Für die Hybridisierungen erwies es sich aus methodischen Gründen als zweckmäßig, das DNA-Fragment F1 (1580 bp) aus dem mittleren Teil des Intron 1 (Gesamtlänge 2452 bp) zu verwenden (Abb. 13). An höhermolekularen Transkripten sind zu erkennen eine 29S-RNA, eine 26S-RNA und eine 23S-RNA in

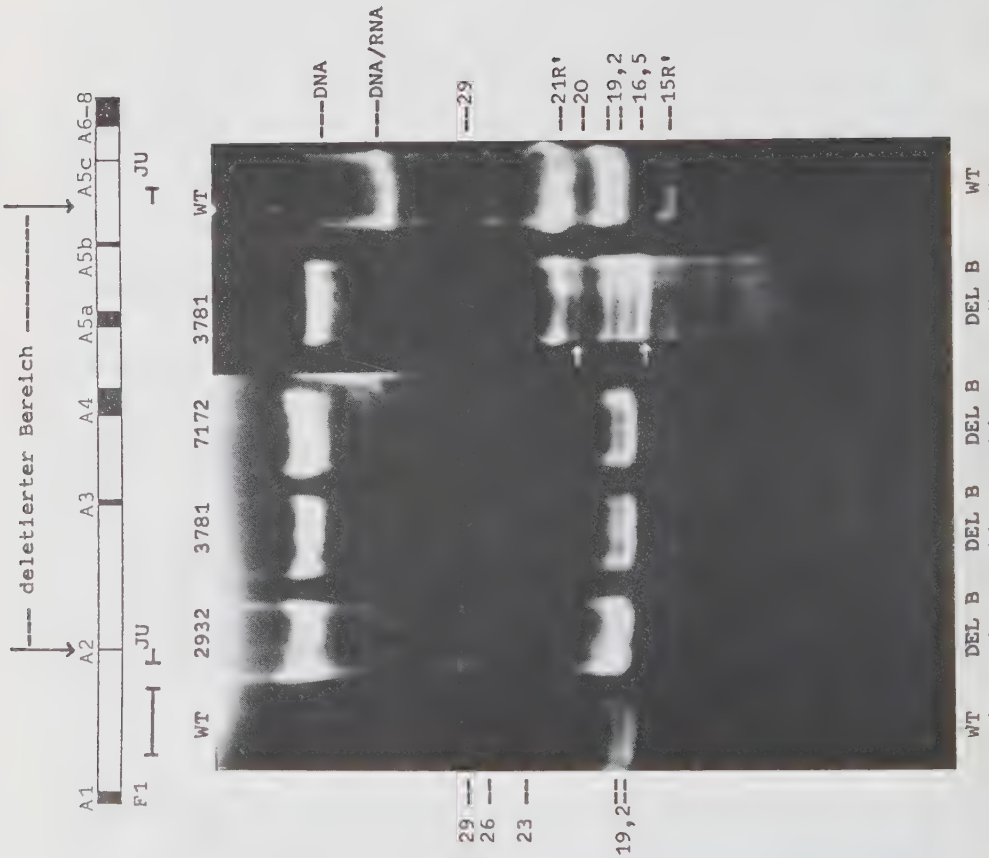


Abb.17 : Transkripte der OXI3-Deletionsmutanten nach Hybridisierung mit den DNA-Fragmenten F1 und JU. (R' = ribosomal)

gleichem Schwärzungsgrad. Dabei handelt es sich offenbar um Stufen der Restprozessierung der Deletionsmutanten, welche zum Teil schon bei Hybridisierungen mit Fragmenten des 3'-Teils dieser Region zu erkennen waren.
Ein Punkt, der immer wieder auffällt, ist die Gleichartigkeit der Transkriptmuster der Vertreter innerhalb der einzelnen untersuchten Gruppen der Deletionsmutanten, was offenbar einen zusätzlichen Hinweis auf ein hohes Maß der Übereinstimmung der Ausdehnung ihres deletierten Bereichs darstellt.
Wichtig ist auch, festzuhalten, daß im hochmolekularen Bereich über 40S mehrere schwache Banden deutlich zu erkennen sind. Dabei handelt es sich um Transkripte, die länger als das OXI3-Gen sind. In Zusammenhang mit weiteren Ergebnissen wird auf dieses Phänomen in der Diskussion näher eingegangen.

Mit der Intron-Probe F1 sind weder eine 13,5S noch eine 16,5S oder eine 20S-RNA nachzuweisen, was ein eindeutiger Hinweis darauf ist, daß diese RNA-Spezies Exonanteile enthalten müssen. Auf den Autoradiogrammen erscheinen als stärkste Signale zwei Banden im Bereich der Größenordnung 19S. Die obere dieser Banden entspricht der für Intron aI1 bei KL14-4A nachgewiesenen 19,2S-RNA (van Ommen et al. 1979; Grivell et al. 1980 und Hensgens et al. 1983), die durch Exzision dieses Introns und anschließende Zirkularisierung der RNA entsteht. Die untere Bande läuft etwa in Höhe eines 19S RNA-Moleküls, und zwar im Wildtyp ebenso wie in den Deletionsmutanten. Da aber in den hier untersuchten Mutanten das Intron aI2 deletiert ist, kann es sich nicht um die 19S-RNA des Introns aI2 handeln. Eine Erklärung für diese Doppelbande ergibt sich aus technischen Gründen, welche im folgenden näher erläutert werden.

6.5. Doppelbanden

Auf den Autoradiogrammen der OXI3-Transkripte des Wildtyps und der mit$^-$-Punktmutanten war schon aufgefallen, daß die zirkuläre 11S-RNA des Introns 5c unter den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bedingungen der Methylquecksilberhydroxid-Gelelektrophorese offenbar als Doppelbande läuft. Das gleiche Phänomen wurde häufig bei der zirkulären 10S-RNA der COB-Region beobachtet (Schmelzer et al. 1981). Grivell et al. (persönliche Mitteilung) haben gezeigt, daß diese 11S-RNA auch im Harnstoff-Gelsystem nach Behandlung mit Mg^{2+}-Ionen bei 37° C als Doppelbande läuft. Dabei wird ein bestimmter Prozentsatz der Ringmoleküle geöffnet. Es erscheint dann je eine Bande für die zirkuläre und die lineare Form (direkt darüber) dieser RNA-Spezies. Zwischenformen treten nicht auf. Arnberg et al. (1980) weisen darauf hin, daß sie in der 11S-Fraktion und der 19S-Fraktion der Transkripte des OXI3-Gens ca. 50 % zirkuläre Formen finden. Eine Klärung dieses Sachverhalts bei Verwendung von Methylquecksilberhydroxid als reversibles Denaturierungsmittel von Nukleinsäuren erlaubt die Veröffentlichung von Bailey und Davidson (1976). In dieser Arbeit wird die denaturierende Fähigkeit dieses Agens an zirkulärer DNA getestet. Der DNA-Ring wird dabei durch das Methylquecksilberhydroxid dissoziiert und in eine lineare und eine zirkuläre Einzelstrangform überführt, und zwar ohne Zwischenformen. Diese beiden Einzelstränge (Zustandsform jetzt ähnlich der RNA) laufen im Agarosegel als zwei separate Banden nahe beieinander (Doppelbande). Ebensolche zwei separaten Banden werden auf den Autoradiogrammen der vorliegenden Arbeit beobachtet, wenn mit einer DNA-Probe aus dem Intron aI1 des OXI3-Gens hybridisiert wird, das ja eine zirkuläre 19,2S-RNA kodiert (Arnberg et al. 1980; Hensgens et al. 1983). Aufgrund der oben erwähnten Argumente kann davon ausgegangen werden, daß die 19,2S-RNA unter den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bedingungen der Methylquecksilberhydroxid-Gelelektrophorese als Doppelbande läuft.

6.6. Hybridisierungen mit dem Fragment F2

Bei dieser DNA-Probe handelt es sich um ein ca. 3'600 Basen langes Fragment, das sich von Intron 2 über Exon A2 und Intron aI1 bis ca. 250 Basen vor Exon A1 erstreckt (Abb.13). Zur Durchführung dieser Transkriptanalyse wurden neben Deletionsmutanten der Gruppe B als Kontrolle auch Deletionsmutanten der Gruppe A gewählt. Da das Fragment F2 aus einem DNA-Abschnitt stammt, der in dieser Gruppe deletiert ist, zeigte sich keinerlei Hybridisierung mit RNA von Mutanten der Gruppe A. Auf den Autoradiogrammen der Hybridisierungen (Gruppe B) mit dem oben genannten ^{32}P-markierten Fragment (Abb. 18) tritt die Doppelbande für die 19,2S-RNA mit dem höchsten Schwärzungsgrad am deutlichsten hervor, da mit diesem Intron aI1 spezifischen Transkript eine Hybridisierungsstrecke von über 2'400 Basen möglich ist, wohingegen das Exon A1 nur eine Länge von 168 Basen aufweist. Schwächere Signale sind für eine 16,5S-RNA und eine 20S-RNA zu erkennen. Diese beiden Transkripte waren schon bei Hybridisierungen mit Fragmenten des 3'-Teils der OXI3-Region aufgetreten. Auffallend sind auch deutliche Signale der Größenordnungen 29S, 26S und 23S. Im Wildtyp sind nur die Banden für die 19,2S und 19S-RNA deutlich zu erkennen, während die 18S-RNA, der reife Messenger, als feine Bande knapp unterhalb des 19S-Bereichs läuft. Auch die im obersten Abschnitt der RNA-Gele laufenden DNA-Bande ergab kein Schwärzungssignal. Dies ist nicht nur eine Kontrolle dafür, daß die Mutanten der Klasse A den Genomabschnitt des Fragmentes F2, mit Exon A1 und Intron aI1, verloren haben, sondern daß auch keinerlei Kreuzhybridisierungen dieses Fragmentes mit anderen Transkripten des Mitochondriengenoms auftreten.

6.7. Hybridisierungen mit dem Fragment F3

Um auf den Autoradiogrammen ein stärkeres Hervortreten von Transkripten mit Exon A1-Anteilen zu erreichen, wurde als weitere DNA-Probe ein ^{32}P-markiertes, 430 Basen langes Fragment am 5'-Ende des OXI3-Gens für die folgenden Hybridisierungen gewählt. Es erfaßt einen Abschnitt des 5'-Leaders vor Exon A1 (Abb. 13), ferner Exon A1 selbst, und reicht ein Stück in das Intron aI1 hinein. Im Wildtyp (Abb. 18; S.65) ist erwartungsgemäß die Doppelbande für die 19,2S-RNA des Introns aI1 und direkt darunter die Bande für den reifen Messenger (18S) zu erkennen. Ferner findet sich die schon bei den Hybridisierungen mit den OXI3-Punktmutanten beobachtete 21S-RNA, welche ein intermediäres Produkt nach Entfernung der ersten beiden Intron darstellt (Bonitz et al. 1980). Diese RNA-Spezies wurde bei den in der vorliegenden Arbeit analysierten Teiltranskripten der Deletionsmutanten niemals beobachtet und muß also aus Bereichen der deletierten Genomabschnitte stammen. Für die Hybridisierungen mit dem Fragment F3 wurden ausschließlich Deletionsmutanten der Gruppe B gewählt, da Mutanten der Gruppe A den hier zu prüfenden Teil der OXI3-Region verloren haben, was anhand des Fragmentes F2 schon gezeigt worden ist. Die am deutlichsten hervortretenden Banden in den Mutanten sind die 16,5S-RNA, die 20S-RNA und die 29S-RNA, wohingegen die 23S und 26S-RNA nur schwach erkennbar sind. Diese fünf Transkriptspezies waren auch schon im 5'-Abschnitt der OXI3-Region nachgewiesen worden. Es handelt sich also um RNA-Moleküle, die Anteile vom 5'-Abschnitt und dem 3'-Abschnitt des Gens für die Cytochrom-c-Oxidase enthalten. Die 19,2S-RNA-Doppelbande des Intron aI1 findet sich als deutlich schwächeres Signal.

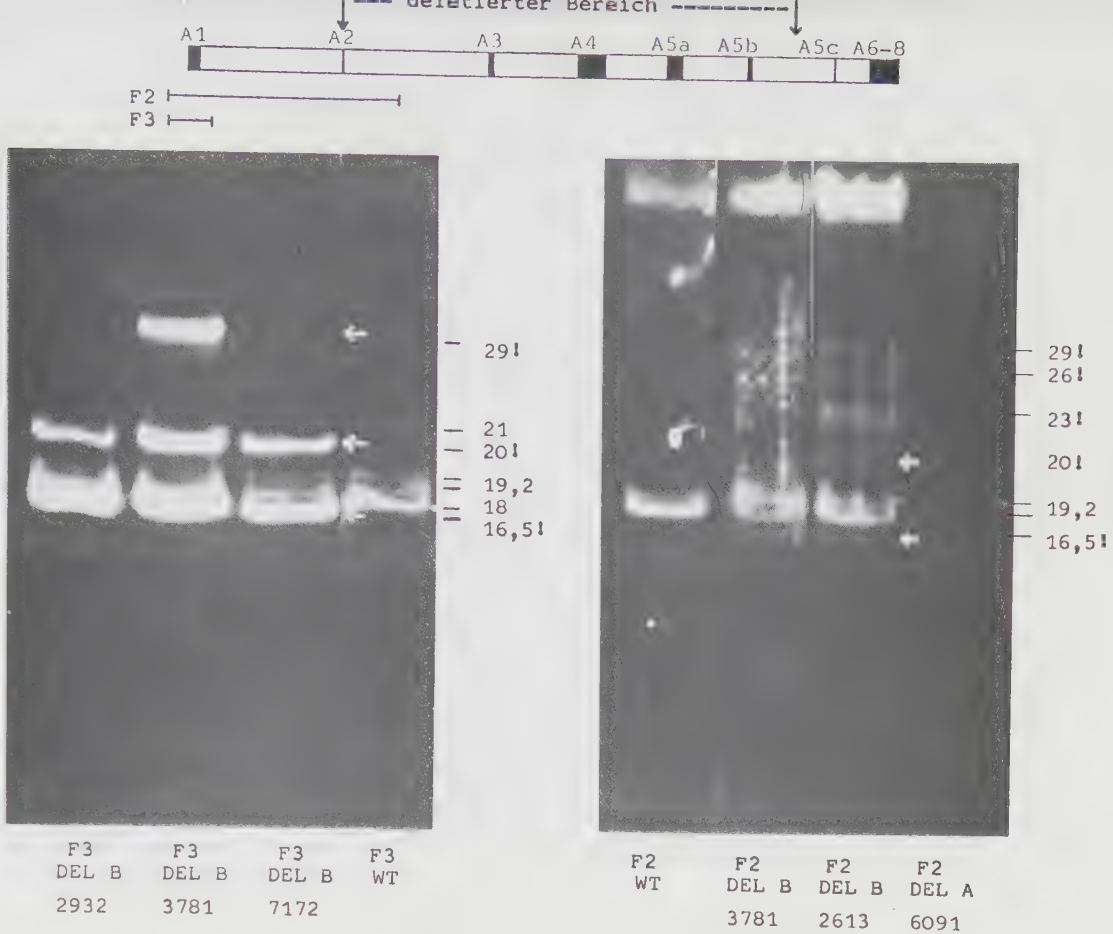


Abb. 18: Transkripte der OXI3-Deletionsmutanten der Gruppe B nach Hybridisierung mit den DNA-Fragmenten F2 und F3. Die mit einem "!" gekennzeichneten Banden sind charakteristisch für die Gruppe B.

6.8. Vergleich der Hybridisierungen der Fragmente F2 und F3

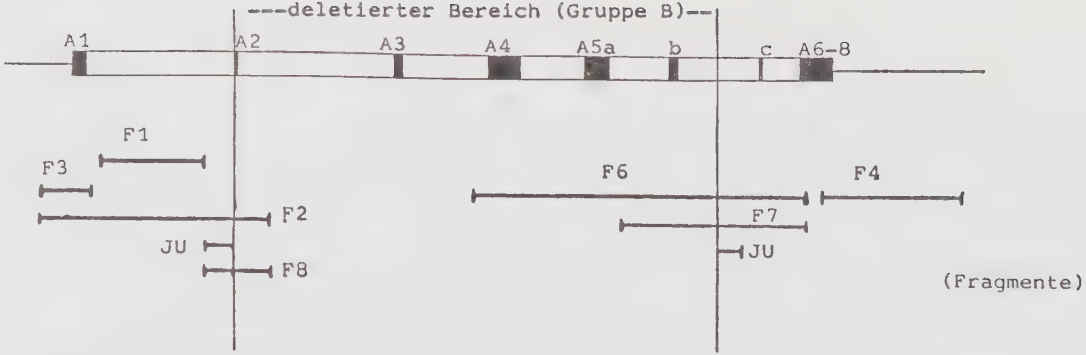
Auffallend und gut erklärbar sind die veränderten Schwärzungsgradrelationen der Banden untereinander, wenn man die Autoradiogramme der Northern-Blots der Fragmente F3 und F2 vergleicht. Der Exon A1-Anteil mit 168 Nukleotiden und der Leader-Anteil mit 264 Nukleotiden beider Fragmente ist gleich (Abb. 13). Mit dem Fragment F2 können aber über 2'400 Nukleotide der RNA des Introns aI1 hybridisieren, wohingegen mit dem Fragment F3 es nur noch 54 Nukleotide sind. Es treten dann also die Banden, die Sequenzen des Exons A1 und des 5'-Leaders enthalten, im Schwärzungsgrad stark hervor (Abb. 18 ; Seite 65).

Die unterschiedlichen Schwärzungsgrade für ein und dieselbe Bande bei verschiedenen Mutanten läßt in gewissem Umfang quantitative Aussagen über die relativen Konzentrationen der Transkripte untereinander zu. So tritt die 29S-RNA dann stärker hervor, wenn die 19,2S-RNS in geringerer Menge vorhanden ist (Abb. 18), während dieselbe 29S-RNA als abgeschwächtes Signal vorliegt, wenn die 19,2S-RNA stärker erkennbar ist (Abb. 18). Da die RNA der Mutanten in geringfügig variierten Stadien der log-Phase gewonnen wurde, läßt sich dies wohl auf unterschiedliche Prozessierungsgeschwindigkeiten der Primärtranskripte bei unterschiedlichen Wachstumsphasen zurückführen.

6.9. Hybridisierungen mit einem "junction"-Fragment

Das "junction"-Fragment (JU) wurde aus einer Deletionsmutanten der Gruppe D9 (3781) gewonnen. Dabei war das im Restriktionsteil der vorliegenden Arbeit identifizierte HpaII-junction der Deletionsgruppe D9 mit HinfI nachgeschnitten worden. Das entstehende, ca. 650 Basenpaare lange Fragment enthält einen DNA-Abschnitt aus dem Intron aI1 und

schließt unmittelbar an das teilweise deletierte Intron 5b an (Abb. 13). Dieses Fragment (JU) stellt also gewissermaßen die Verbindung zwischen dem 5'-Teil und dem 3'-Teil der OXI3-Region dar. Das aber heißt, daß bei der Hybridisierung mit der RNA der Deletionsmutanten sowohl die Banden, welche mit dem Fragment F1 aus Intron aI1 auftreten, als auch zusätzliche Banden für Transkripte, in denen das Intron 5b enthalten ist, zu erwarten sind. Das Autoradiogramm eines Northern Blots mit dem Fragment JU (Abb.17; S.60) bestätigt diese Feststellung. Es findet sich die 19,2S-RNA, die für das Intron aI1 charakteristisch ist. Ferner sind die Banden der 29S, 26S und 23S-RNA zu erkennen. Bei der sichtbaren 21S-RNA handelt es sich um ribosomale Kontamination. Außerdem treten anders als bei Fragment F1, jetzt zusätzlich eine 16,5 und eine 20S-RNA auf. Das sind zwei RNA-Größen, die schon bei den Transkriptanalysen anderer Abschnitte des OXI3-Restgens der Deletionsmutanten mit Fragmenten, die Exonsequenzen enthielten, in Erscheinung getreten waren. Das bedeutet, daß die Sequenz des Restintrons aI5b dadurch in der 16,5S und der 20S-RNA der Deletionsmutanten nachgewiesen worden ist. Auf Seite 68 sind die Ergebnisse noch einmal tabellarisch aufgeführt.



Tab. 4: Transkriptetabelle der untersuchten Deletionsmutanten

(Gruppe B) F3	F2	F1	F8	JU	F6	F7	F4	F6	F7	F4	(Gruppe A) (S-Werte)
+++	++	+++	+++	++	++	++	+	-	-	-	29
+	++	+++	+++	++	+	+	+	-	-	-	26
+	++	+++	+++	++	x	x	x	-	-	-	23
++++	++	-	-	++++	++	++++	++	-	-	-	20
++	+++	++++	++++	++++	-	-	-	-	-	-	19,2
x	x	x	x	x	++	++++	++	++	+++	++	18
++++	++	-	-	++++	++	++++	++	-	-	-	16,5
-	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	++	13,5
-	-	-	-	-	++	++++	-	++	+++	-	11

x= durch andere Bande verdeckt

═══ = auch im WT vorhanden

7. Analyse der Deletionsendpunkte von Mutanten der Gruppe B

Die vorausgegangenen RNA-Analysen an den Deletionsmutanten der Gruppen A und B hatten ein vielfältiges Muster der Teiltranskripte offenbart. Eine Prozessierung des Primärtranskriptes der OXI3 Region war somit noch möglich. Ein wichtiges Ergebnis war, daß die 19,2S RNA des Intron 1 auftritt, obwohl im Anschluß an dieses Intron in Gruppe B große Teile des OXI 3-Gens deletiert sind. Dadurch wird die Frage aufgeworfen, ob das Exon A2 ganz oder teilweise deletiert ist. Außerdem ist für die Ermittlung der Zusammensetzung der einzelnen Prozessierungs-Zwischenprodukte die genaue Kenntnis der Lage der Deletionsendpunkte im OXI3 Gen der Mutanten nötig. Eine geeignete Methode, diese Sachverhalte aufzuklären, ist die Sequenzierung der Fusionsfragmente der mit⁻ Deletionsmutanten. Ein derartiges Fusionsfragment enthält den im folgenden als Nahtstelle bezeichneten Sequenzabschnitt, an dem die retenierten Genomteile der Deletionen aufeinandertreffen.

Alle vorstehend beschriebenen Untersuchungen haben auf die gruppenspezifische Gleichartigkeit oder Ähnlichkeit der Lage der Deletionsendpunkte trotz unabhängiger Mutagenese der Mutantenstämme im OXI 3-Gen hingewiesen. Innerhalb von nur vier definierten Sequenzbereichen der OXI3 Region entstehen also Deletionen bevorzugt. Durch DNA-Sequenzanalyse sollte feststellbar sein, ob sich in den Fusionsfragmenten Sequenz-Homologien befinden, die Rückschlüsse auf einen Mechanismus der Deletionsentstehung zulassen.

7.1. Eingrenzung der Deletionsendpunkte

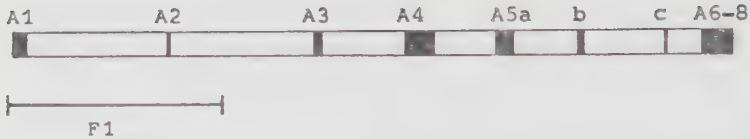
Alle weiteren Bemühungen waren nun darauf gerichtet, zwei der Deletionsendpunkte exakt zu lokalisieren. Voraussetzung für

die Sequenzierung ist die Feinkartierung der Fusionsfragmente und die Identifizierung eines geeigneten Junctions, welches die Nahtstelle der Deletionen enthält. Wegen der gruppenweise Gleichartigkeit der Deletionsendpunkte wurden zwei Deletionsmutanten (3781 und 7172) ausgewählt, die als repräsentative Beispiele für die Deletionsgruppe B sequenziert werden sollten. Von beiden genannten mit⁻ -Deletionsmutanten lagen bereits genetische Kartierungen und Transkriptanalysen vor, so daß als nächster Schritt die Feinkartierung der Deletionsgrenzen in Angriff genommen werden konnten.

Als Vorbereitung der Durchführung der Sequenzierung war es zunächst notwendig, die bereits vorhandene, einfache Restriktionskarte der Deletionsmutanten zu verfeinern, was vor allem durch sekundäre Restriktion der Fusionsfragmente erreicht wurde. Ein wichtiges Ziel dieser Kartierung war es, direkte Vergleichsmöglichkeiten zwischen den Stämmen D273-10B, KL14-4A und 777-3A zu schaffen. Bei diesen Arbeiten wurde von Anfang an bezüglich der Nahtstelle zwischen dem 5'-Teil (Cluster C5/C6) und dem 3'-Teil (Cluster C18/C19) der zurückbehaltenen DNA-Abschnitte der OXI 3-Region unterschieden (Abb.11). Der Stamm D273-10B diente als Vergleichsstamm für den 5'-Abschnitt der Region, da sowohl eine genaue Restriktionskarte als auch die komplette Sequenz bereits veröffentlicht war (Bonitz et al. 1980). Als Vergleichsstamm für den 3'-Abschnitt des OXI 3-Gens wurde der Stamm KL14-4A gewählt, da hier die Sequenzen der Introns 15A und 15B publiziert vorlagen (Hensgens et al. 1983). Diese beiden Introns entsprechen den Insertionen IIA und IIB (Sanders et al. 1977) des Stammes 777-3A, und die bisher verfügbaren Daten hatten ja ergeben, daß die meisten Deletionen in eben dieser Insertion IIB enden.

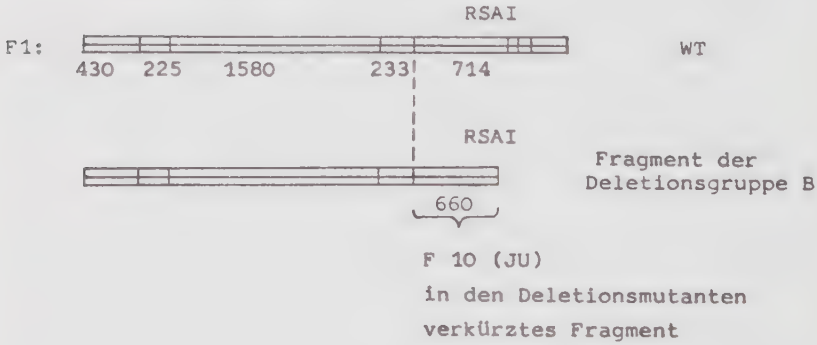
Der 5'-Teil der OXI 3-Region wurde anhand des HpaII-Fragments F2 (ca. 3600 bp) des Wildtyps näher analysiert. Dieses Fragment war auch bei schon bei den Transkriptuntersuchungen für Hybridisierungen verwendet worden. Das HpaII-Junction der Deletionsmutanten (ca. 2900 bp), welches ein verkürztes F2-Fragment ist, wurde parallel unter gleichen Bedingungen kartiert, um auf diese Weise den Deletionsendpunkt No. 2 näher einzugrenzen. Wesentliches Ziel war es, die Anordnung der verschiedenen Restriktionsschnittstellen weiterer Enzyme auf diesem Fusionsfragment festzustellen und mit den Restriktionsmustern des Wildtyps zu vergleichen. Zu diesem Zweck wurde sowohl das F2-Fragment des Wildtyps als auch das entsprechende HpaII-Junction der ausgewählten Deletionsmutanten eluiert und mit den Enzymen HinfI/MboI/RsaI/SauIIIA/EcoRII und ScrFI einer sekundären Restriktion unterworfen (Abbildung hierzu auf der nächsten Seite).

Auf diese Weise war eine Eingrenzung der Nahtstelle im Bereich des Exons A2 auf ca. ± 30 bp möglich. Die Auflösung ist vor allem begrenzt durch die Genauigkeit der Molekulargewichtsbestimmung von Restriktionsfragmenten in Agarosegelen und der Position von Restriktions-Sites in der Nähe von Exon A2. Der erste wesentliche Befund war, daß im Rahmen der Zuverlässigkeit der verwendeten Restriktionsmethoden sich die Stämme D273-10B und 777-3A in dem betrachteten Genabschnitt in 5'-Richtung als völlig identisch erwiesen. Auffallend war hier die Gleichartigkeit der Restriktionsmuster der untersuchten Deletionsmutanten. Beide verwendeten Stämme der Klassen K VIII und K IX besaßen die gleichen Größen der HpaII-Junctions, was bereits auf eine sehr ähnliche Lage des Beginns und des Endes des deletierten Bereichs hindeutete.
Das zweite wichtige Ergebnis war das Auffinden weiterer und vor allem kleinerer Übergangsfragmente (Junctions),



Hpa II Fragment = F1

zweite Restriktion mit HinfI



"sticky ends" des Fragmentes F10 (JU) :

```
5' GATTCA..junction(F10)..CCGG 3'
3' CTAAGT..              ..GGCC 5'
```

Abb. 19: Weg der Sequenzierung zur Nahtstelle.
Einzelheiten im Text S.71 .

welche für die Durchführung der Sequenzierung nach Maxam-Gilbert (1977) geeignet waren. Aus dieser Gruppe wurde das HinfI-Fragment F10 (JU) ausgewählt und im folgenden näher untersucht.

7.2. Sequenzierung von Junctions der Deletionsgruppe B

Das Junction-Fragment F10 (JU; ca. 660 bp) hat aufgrund der durchgeführten sekundären Restriktion zwei verschiedenartige Enden. Das 3'-Ende kam durch einen HpaII-Schnitt zustande, während es in 5'-Richtung durch eine HinfI-Site begrenzt wird. Es handelt sich dabei um sogenannte "sticky ends", die aufgrund ihrer Beschaffenheit für eine radioaktive Endmarkierung mit $a^{32}P$ genutzt werden können. In diesem Fall kann mit Hilfe der Klenow-Polymerase wahlweise $\alpha^{32}P$-ATP (HinfI-Site) bzw. $\alpha^{32}P$-CTP (HpaII-Site) eingebaut werden. Mit Hilfe dieser Methode konnte dieses Fragment sowohl in 3'- als auch in 5'-Richtung der genannten Schnittstellen auf die Nahtstelle der mit$^-$-Deletionsmutanten zu sequenziert werden. Es sollte dadurch eine möglichst große Strecke der DNA vor und nach der Nahtstelle gelesen werden können, um eine breite Basis für den Vergleich mit den in der Literatur veröffentlichten Wildtyp-Sequenzen zu besitzen. Ziel war es also, nicht nur die Nahtstelle selbst exakt zu lokalisieren, sondern auch in ihrer weiteren Umgebung eventuell vorhandene Insertionen, Rearrangements oder mögliche zusätzliche, kleine Deletionen zu entdecken. Außerdem sollten Sequenzunterschiede der im WT 777-3A induzierten mit$^-$-Deletionsmutanten im Vergleich mit den WT- Stämmen KL14-4A und D273-10B festgestellt werden.

Die technische Durchführung erfolgte mittels gestaffelter Sequenzgelläufe, die ein überlappendes Lesen der jeweiligen Basenfolge ermöglichten. Die Fusionsfragmente der mit$^-$-Deletionsmutanten 7172 und 3781 der übergeordneten Gruppe B

wurden parallel zueinander von den α-^{32}P-markierten Enden her größtenteils sequenziert. Die Basenfolge beider untersuchten Mutanten erwies sich in allen verglichenen DNA-Abschnitten als völlig identisch. Bei der Mutante 3781 konnte zusätzlich die Nahtstelle aufgelöst werden (Abb. 20). Die Sequenz geht an dieser Stelle, aus dem mittleren Teil des Introns 5b kommend (Base 10807), direkt in das Ende von Intron aI1 (Base 2619) über. Das sequenzierte Fusionsfragment F10 (JU) setzt sich also aus 357 bp von Intron aI1 und 289 bp von aI5b zusammen.

Der Deletionsendpunkt im Intron aI1 liegt exakt an der Stelle, die Bonitz et al. (1980b) als splice point der 19,2S-RNA angeben. Er befindet sich in einer Serie von fünf T-Basen, die vor Exon A2 liegen. Die genannte Basenfolge wurde von G. Weiler (Diplomarbeit) unter Verwendung einer anderen Technik (γ-^{32}P Endmarkierung und Strangtrennung) bei den Mutanten 3781, 2932 und 2613 an der gleichen Stelle gefunden. Die genannten Deletionsendpunkte dürfen also auch aufgrund der Sequenzierungsergebnisse als hot spots der Deletionsentstehung angesehen werden.

Vergleicht man die Basenfolge mit der entsprechenden Sequenz im Wildtyp KL14-4A, so finden sich drei einzelne (Abb.22) Sequenzabweichungen. Es handelt sich dabei um ein G in der mit$^-$-Deletionsmutante anstelle eines A im WT (22 bp downstream der Naht). Ferner ist ein T des Wildtyps durch ein C in der Mutante ersetzt (79 bp downstream der Nahtstelle). Die für die durchgeführte Restriktionskartierung wichtigste Änderung ist das Neuauftreten einer HpaII-Site 287 bp downstream der Nahtstelle. Diese Restriktions-Site stellt zugleich das rechte Ende des sequenzierten Fusionsfragmentes dar (Abb. 21). Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich hierbei um Sequenzunterschiede zwischen den Stämmen 777-3A

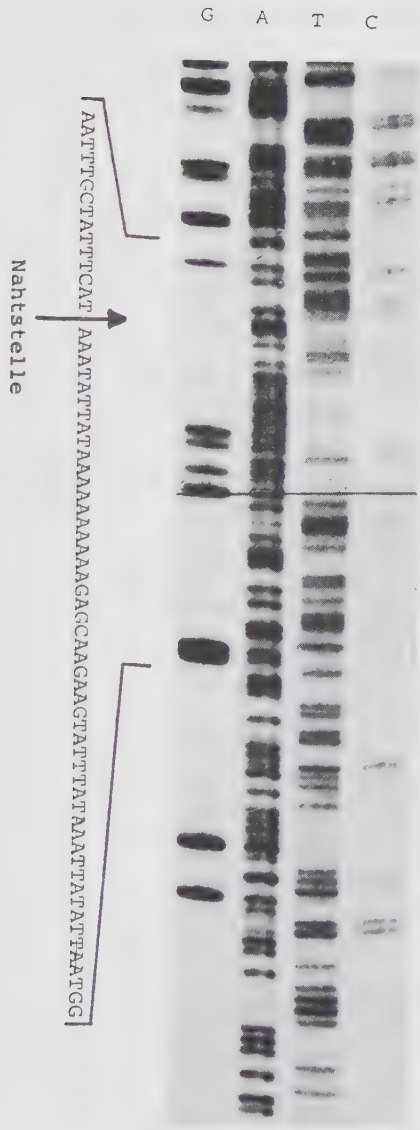
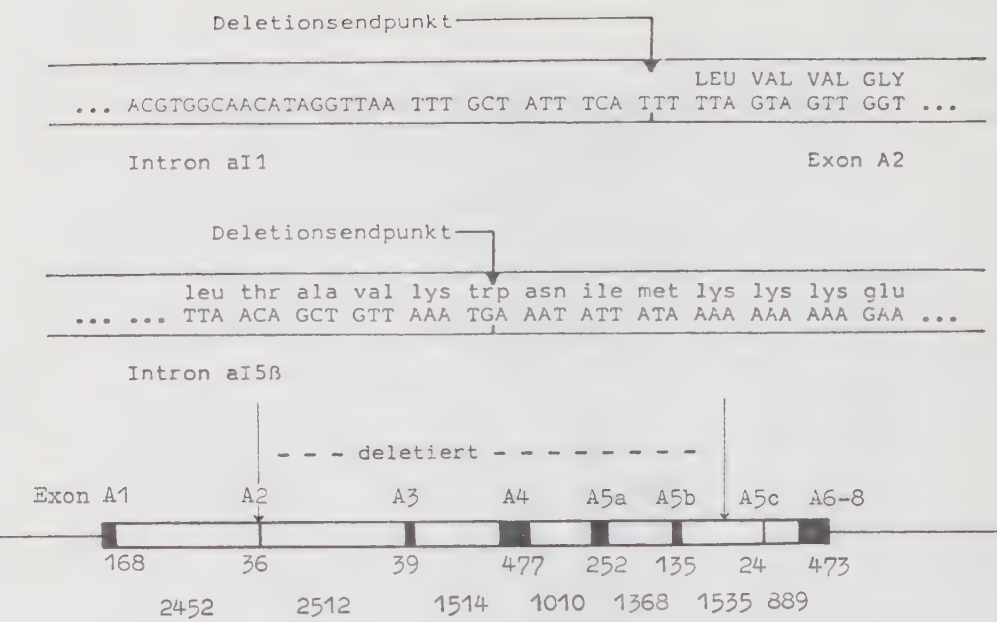


Abb. 20:

Basenfolge der mit del 3781 im Bereich der Nahtstelle

(8% Harnstoff-Sequenzgel)



(Die Zahlenangaben beziehen sich auf eigene Sequenzdaten und auf veröffentlichte Werte von Bonitz et al. 1980 b (D273- 10B) und Hensgens et al. 1983a (KL14-4A).

Abb. 21:

Lage der Deletionsendpunkte in der Wildtypsequenz des Stammes 777-3A.

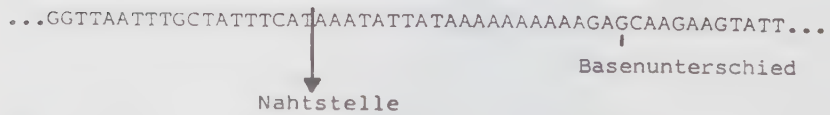


Abb. 22:
Nahtstelle der mit Deletionsmutante 3781 (Gruppe B) aus Stamm 777-3A. Basenunterschied im Vergleich mit KL14-4A.

und KL14-4A, und nicht um Besonderheiten der untersuchten mit$^-$-Deletionsmutanten. Um dieser Frage weiter nachzugehen, wurde mit dem Fusionsfragment F10 ein Hybridisierungsexperiment nach Southern (1975) durchgeführt.

7.3. Einordnung eines Fusionsfragmentes in die Wildtypsequenz

Das Junction F10 wurde ^{32}P-nicktranslatiert und gegen die mit HpaII geschnittene DNA der Wildtypen 777-3A und KL14-4A sowie gegen die mit$^-$-Deletionsmutante 7172 (Gruppe B) hybridisiert. Dieses Southern-Experiment sollte der Identifizierung der Wildtyp-Originalfragmente dienen (Abb. 23). Das Autoradiogramm dieses Hybridisierungstests weist eine Bande bei 3600 bp auf. Es handelt sich hierbei um das oben genannte Fragment F2, welches das zugehörige Originalfragment des 5'-Teils des Fusionsgragments F10 ist. Diesem Fragment F2 entspricht das verkürzte HpaII-Fragment von ca. 2900 bp der mit$^-$-Deletionsmutanten. Ferner hybridisiert das Junction F10 im WT KL14-4A mit einem HpaII-Fragment von 1800 bp, welches im rechten Teil der OXI3-Region liegt. Es fehlt im Wildtyp 777-3A aufgrund der zusätzlichen HpaII-Site dieses Stammes. Statt dessen findet sich in diesem Wildtyp ein Originalfragment von 300 bp Länge. Das bedeutet, daß die HpaII-Site nicht deletionsspezifisch, sondern bereits in dem dazugehörigen Wildtyp 777-3A vorhanden ist. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, daß die Sequenzabweichungen der untersuchten mit$^-$-Deletionsmutanten gegenüber dem Vergleichsstamm KL14-4A nicht Besonderheiten der Mutanten, sondern des Wildtyps 777-3A, in dem sie induziert wurden, sind. Auffallend ist, daß die genannten Sequenzabweichungen ausschließlich im Intron 5b gefunden wurden. Hierbei handelt es sich um ein fakultatives Intron, dessen offener Leserahmen nicht an ein Exon anschließt. Hensgens et al. (1983a) fanden, verglichen mit dem WT D273-10B, auch in den naheliegenden Exons 5b und 5a ähnliche Sequenzabweichungen.

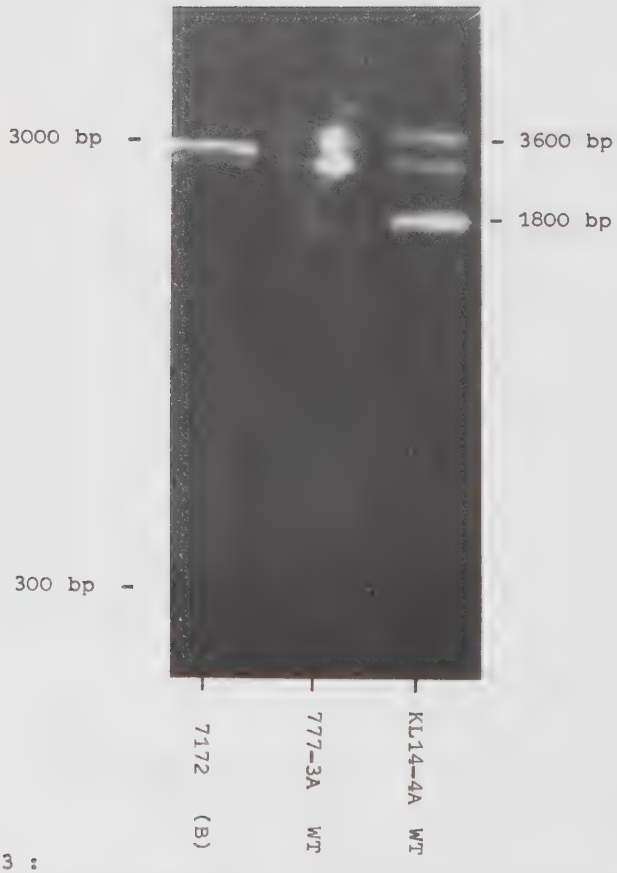


Abb. 23 :

Autoradiografie("Southern Blot"): Hybridisierung eines Junktion-Fragmentes (F 10) einer Deletionsmutante der Gruppe B (3781) mit der DNA von Wildtypen und einer weiteren Deletionsmutanten der Gruppe B (7172).

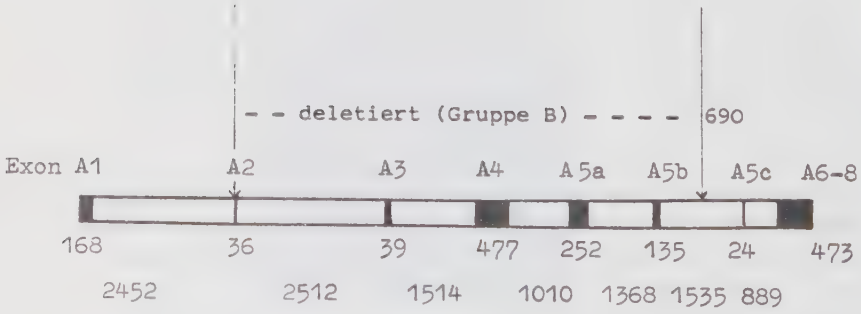
D. Diskussion

Ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Beitrag zur Aufklärung des Prozessierungsverlaufs der RNA des OXI3-Gens vom Primärtranskript zum reifen Messenger zu leisten. Dazu wurde vor allem die Northern-Blot Methode (Bailey et al. 1976; Lehrach et al. 1977) verwendet. Nach Hybridisierung mit einer DNA-Probe, die einen großen Teil der OXI3-Region überdeckt, war eine Vielzahl von Transkript-Zwischenstufen zu erkennen. Transkriptanalysen mit DNA-Fragmenten der OXI3-Region des Stammes 777-3A (langes Genom) zeigten mehr als 30 verschiedene RNA-Banden auf den Autoradiogrammen. Sogar im WT-Stamm D273-10B (kurzes Genom) sind noch über 20 verschiedene RNA-Banden zu erkennen. Eine derartige Komplexität der Reifungsvorgänge der RNA war zu erwarten, da das OXI3-Gen beim WT 777-3A (langes Genom) über 12'400 bp lang ist, während für die Kodierung der Untereinheit I lediglich 1'530 Nukleotide nötig sind (Bonitz et al. 1980b). Allen untersuchten Stämmen gemeinsam ist eine 18S-RNA, welche als reifer Messenger für die Untereinheit I der Cytochrom-c-Oxidase betrachtet wird (Hensgens et al. 1983b).

Um weitergehende Informationen über den Verlauf der Prozessierungsvorgänge des OXI3-Gens zu erhalten, sollte unter anderem die Verwendung von Deletionsmutanten, die große Teile dieser Region verloren haben, die Betrachtung der Prozessierungs-Vorgänge an einer verminderten Zahl von Exons und Introns erlauben. Zur Feststellung, ob mitochondrial kodierte Polypeptide den Prozessierungsverlauf katalysieren, wurde eine Transkriptanalyse von mtRNA aus mit Chloramphenicol behandelten Hefezellen durchgeführt.

1. Prozessierungsverlauf der Messenger-RNA in Deletionsmutanten der OXI3-Region

Im Rahmen der Transkriptstudien an Mutanten der OXI3-Region war bei den Deletionsmutanten ein vielfältiges Transkript-Muster zu beobachten. Es wies darauf hin, daß hier ebenfalls eine Prozessierung der mRNA möglich ist. Dieser Beobachtung soll nun genauer nachgegangen werden. Dazu ist es erforderlich, die Zusammensetzung des jeweiligen Deletionsgenoms möglichst exakt zu kennen und zu analysieren. In der folgenden Abbildung sind die einzelnen Genomabschnitte mit genauen Zahlenangaben für die verschiedenen Teilabschnitte des Gens (in Nukleotiden) aufgeführt.



Die Zahlenangaben beziehen sich auf eigene Sequenzdaten und auf veröffentlichte Werte von Bonitz et al. 1980b (D273-10B, kurzes Genom) und Hensgens et al. 1983a (KL14-4A, langes Genom).

Zur Interpretation der beobachteten Prozessierungsvorgänge ist es zunächst nötig festzustellen, wie groß der längste Precursor der Deletionsmutanten überhaupt sein kann. Voraussetzung dafür ist, nicht nur die Ausdehnung der Exons und Introns dieses Gens zu berechnen, sondern auch den Start der Transkription, die Länge des 5'-Leaders sowie die Größe des 3'-Endes zu kennen. Osinga und Tabak (1984a) haben den Transkriptionsstart des OXI3-Gens sequenziert und geben die Länge des 5'-Leaders mit 540 Nukleotiden an. Die Länge des 3'-Endes der RNA der OXI3-Region beträgt 67 Basen (Osinga et al. 1984b), wobei dieses 3'-Ende direkt an die kodierenden Bereiche anschließt.

Faßt man alle oben genannten Daten zusammen, so ergibt sich für das zu erwartende Primärtranskript des Restgenoms der Deletionsmutanten der Gruppe B eine Länge von:

540 + 168 + 2450 + 690 + 24 + 889 + 473 + 67 = 5301 b
5' A1 aI1 aI5b A5c aI5c A6-8 3' (Genomabschnitt)

Vergleicht man diesen Zahlenwert mit der S-Werteskala, so entspricht diese Größenordnung einer 29S-RNA. Diese 29S-RNA wurde auch tatsächlich als höchst-molekulare, klar erkennbare Bande auf den Autoradiogrammen der entsprechenden Northern Blots entdeckt (Tab.4, S. 68).

Die weiteren Überlegungen gelten nun der Art und Weise der Reifung dieses größten Precursors der Deletionsmutanten. Die grundlegende Voraussetzung für die Berechnung der Zusammensetzung der bei der Prozessierung entstehenden Teiltranskripte ist, daß das Splicing nicht wahllos irgendwo an der RNA stattfindet, sondern an den Exon/Intron-Grenzen. Dies ist durch eine Vielzahl von Veröffentlichungen belegt (reviewed by Abelson, 1979; Breathnach und Chambon, 1981). Oftmals findet man eine Polarität der Reifungsschritte der

mRNA, d.h. die Introns eines Mosaikgens werden nicht willkürlich, sondern in einer bestimmten Reihenfolge exzisiert. So wurde am "Split-Gene" COB des Mitochondriengenoms eine schrittweise Prozessierung vom 5'-Bereich des Gens in Richtung des 3'-Endes festgestellt, wobei das Splicing eines nachfolgenden Introns ohne Herausnahme der vorhergehenden nicht möglich ist (Haid et al. 1980; Halbreich et al. 1980; Schmelzer et al 1981). Andere Verhältnisse finden sich am Mosaikgen OXI3. Transkriptionsstudien an einer Reihe von Mutanten dieses Gens haben keine Hinweise für eine lineare Progression der Splicing-Ereignisse erbracht (Grivell et al. 1982 u. Hensgens et al. 1983). Diese Aussage steht auch in Einklang mit der Beobachtung, daß sehr viele Teiltranskripte gebildet werden. Das gleichzeitige Erscheinen einer großen Zahl von verschiedenen Zwischenprodukten läßt vermuten, daß nicht ein einziger obligatorischer "Pathway" existiert.
Für die folgenden Berechnungen der Zusammensetzung und Herkunft der Transkripte der OXI3 Deletionsmutanten kann also weder von einer linearen Progression noch von einem strikt ablaufenden und unveränderbaren Pathway ausgegangen werden. Im Gegenteil, es müssen alle Möglichkeiten der Zerlegung und Neuzusammensetzung der Transkripte diskutiert werden.

2. RNA-Vorstufen in mit Chloramphenicol behandelten WT-Zellen

Nach Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese mit Chloramphenicol konnten noch Transkripte der Größenordnung 42S mit einer OXI3-spezifischen Probe nachgewiesen werden. Diese Transkriptlängen gehen weit über die Länge des OXI3-Gens hinaus. Exakte Angaben über Transkriptlängen, die höher als 32S liegen, sind allerdings schwer möglich, da diese Größenordnungen in dem in dieser Arbeit verwendeten Gelsystem nur noch annähernd bestimmt werden können. Derartige überlange

Transkripte wurden auch mit einer DNA-Probe aus Intron aI1 in der RNA einiger Deletionsmutanten entdeckt. Van Ommen et al. (1979) beobachteten ähnliche überlange Transkripte, wenn sie mit OXI3-Proben oder mit Proben der benachbarten OLI2-Region hybridisierten. Möglicherweise bilden das OXI3-Gen und das OLI2-Gen bzw. das dazwischenliegende aap 1 Gen eine gemeinsame primäre Transkriptionseinheit.(Abb. 24).

Die RNA-Synthese beginnt vor der OXI3-Region an einer Nona-Nukleotidsequenz der Basenfolge 5'-ATATAAGTA- 3'. Diese Sequenz wurde zuerst von Osinga et al. (1982) als Transkriptions-Initiationssequenz entdeckt, ist aber auch vor anderen mitochondrialen Genen gefunden worden. Sie befindet sich aber nicht im Bereich zwischen OXI3 und den nachfolgenden Genen aap1 und OLI2 (Hensgens et al. 1984). Es ist daher wahrscheinlich, daß diese genannten Gene gemeinsam transkribiert werden. Ihr gemeinsamer Precursor könnte dann einem schrittweisen Processing unterworfen sein, das zur Bildung der einzelnen mRNAs führt. Diese Möglichkeit wird durch die Tatsache unterstützt, daß das 3'-Ende der OXI3-Messenger-RNA und das 5'-Ende der mRNA der aap1-OLI2 Region im Bereich einer Dodekamer-Sequenz aufeinandertreffen, die auch am 3'-Ende anderer Gene gefunden wird (Osinga et al. 1984b). Diese Folge von 12 Basen stellt dann möglicherweise eine "Processing-site" dar, an der das gemeinsame primäre Transkript getrennt wird.

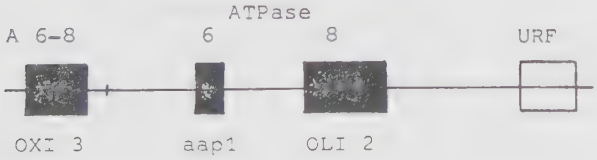


Abb.24: Gene im Anschluß an das 3'-Ende der OXI3-Region

Ein wichtiges Ergebnis der dargestellten Untersuchungen ist, daß die Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese mit CAP zu einer deutlichen Blockierung des Processing der Messenger-RNAs führt. Das bedeutet, daß die Reifung der OXI3 mRNA offenbar von mitochondrialer Translation abhängt, was mit den Ergebnissen der CAP-Untersuchungen am Mosaikgen COB in Einklang steht (Schmelzer et al. 1982). Diese Beobachtungen bestätigen die schon länger bekannten Hinweise dafür, daß mitochondriale Proteine am Splicing der mRNA-Vorstufen beteiligt sind (Reviews: Lewin 1980; Grivell u. Borst 1982 und OXI3 betreffend Hensgens et al. 1983b). Die Untersuchungen am Processing des Mosaikgens COB führten durch den Nachweis einer Proteinbeteiligung am Splicing zur Entwicklung des sogenannten Maturasemodells. Die Exzision des zweiten Introns und des vierten Introns der COB-Region wird nach diesem Modell durch Proteine vermittelt, welche jeweils von einem großen Teil des herauszuschneidenden Introns selbst zusammen mit den ersten beiden Exons bzw. den vorangehenden 4 Exons kodiert werden (Jacq et al. 1980; de La Salle et al. 1982).

In jedem der ersten vier Introns der OXI3-Region findet man ebenfalls offene Leserahmen in Phase mit den vorausgehenden Exons, die darauf hindeuten, daß auch hier intron-kodierte Maturasen an der Weiterbearbeitung der RNA-Precursor beteiligt sind. Im Falle des Introns aI1 konnte ein derartiges Protein bereits nachgewiesen werden (Carignani et al. 1983). Auch hier ist das Intron selbst für seine Exzision mit verantwortlich. Die Vorstellung, daß RNA-Splicing in Hefe-Mitochondrien von mRNA Maturasen abhängt, wird von vielen Arbeitsgruppen vertreten (Reviews: Lewin 1980; Grivell u. Borst 1982).

3. Zusammensetzung der Transkripte von Deletionsmutanten der OXI3-Region

Die Existenz der von Bonitz et al. (1980b) postulierten beiden Insertionen zwischen Exon A6 und A7 bzw. A7 und A8 konnte in den folgenden Jahren nicht bestätigt werden. Deshalb werden diese drei Exons in den folgenden Berechnungen der Restprozessierung der Deletionsmutanten als geschlossener Block A6-8 betrachtet.

Die Anzahl der Messenger-Vorstufen, mit denen eine Intronprobe hybridisiert, ist ein wichtiger Hinweis für die Berechnung der Anzahl der Splicing-Ereignisse außerhalb dieses Introns. Hybridisiert diese Intronprobe mit einer oder mehreren der Vorstufen, so ist das getestete Intron noch vorhanden. Das bedeutet, daß bis dahin Intron-Exzisionen an einer anderen Stelle der Precursor-RNA stattfanden. Da aber die Prozessierung der Transkripte der Mosaikgene eine Serie von Intron-Exzisionen ist, läßt die Anzahl der Vorstufen direkte Rückschlüsse auf die Anzahl der am "Processing" beteiligten Introns zu.

Im Falle des verkürzten OXI3-Gens der Deletionsmutanten stehen aber für Exzisionsvorgänge außer Intron aI1 nur noch Intron 5b-Rest und Intron 5c zur Verfügung. Als Teiltranskript entspricht dem Intron 5c des OXI3-Gens eine 11S-RNA (van Ommen et al. 1979; Grivell et al. 1982), von der Arnberg et al. (1980) zeigte, daß sie nach der Exzision zirkularisiert wird. In den Transkriptstudien mit Fragmenten des 3'-Teils der OXI3-Region an Mutanten der Deletionsgruppe A wie auch Gruppe B, konnte eben diese 11S-RNA nachgewiesen werden. Das Transkript des Introns a5c kann also auch in den Deletionsmutanten exzisiert werden, obwohl ein großer Teil des OXI3-Genoms verlorengegangen ist. Beweise dafür,

daß die Exzision der 11S-RNA unabhängig vom Rest des OXI3-Gens oder von anderen Teilen des Mitochondriengenoms verläuft, hatten auch Arbeiten der Amsterdamer Gruppe gebracht. Sie hatten gezeigt, daß die 11S-RNA (Intron 5c) auch in rho$^-$-Klonen und in syn$^-$-Mutanten, welche eine stark verminderte Proteinsyntheserate aufweisen, normal exzisiert und zirkularisiert wird (Grivell et al. 1982; Hensgens et al 1983). Die Autoren schließen daraus, daß der Vorgang der 11S-Exzision kernkodiert ist.
Die Exzision der 11S-RNA führt zu einem Teiltranskript folgender Größe: 5301 - 889 = 4412 (b). Diese Anzahl an Nukleotiden entspricht einer 26S-RNA der Svedberg-Skala.
Eine solche RNA-Spezies wurde in den Deletionsmutanten der Gruppe B nachgewiesen (siehe Tabelle der Transkripte 4,S.68).

5'L	A1	aI1	aI5b-Rest	A5c	aI5c	A6/7/8	3'T	29S
540	168	2450	690	24	889	473	67	5301 b

11S Exzision

Besonders aufschlußreich für die Berechnung des Rest-Processing der RNA der Deletionsmutanten war der Northern-Blot mit einer DNA-Probe aus Intron aI1 OXI3. Er ergab 1.) daß die 19,2S-RNA dieses Introns noch exzisiert wird und 2.) daß dieses Intron auch noch in 3 weiteren höhermolekularen RNA-Vorstufen (29/26/23S) enthalten ist.
Weitere Feststellungen sind, daß Mutanten im Intron aI1 die Exzision der 19,2S-RNA verhindern und daß in diesem Intron eine mRNA-Maturase gebildet wird (Carignani et al. 1983). Das Protein des Introns 1 kann offenbar von den Deletionsmutanten der Gruppe B noch gebildet werden, da der deletierte Bereich erst am Ende des Introns aI1 beginnt.

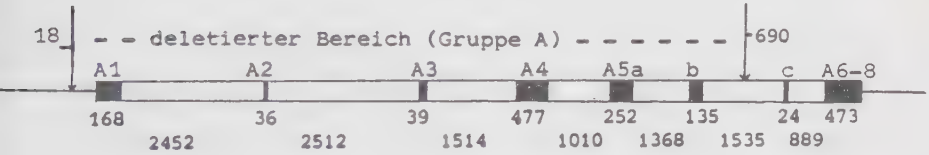
Zusammensetzung der mRNA der Mutanten der Deletionsgruppe A :

5'	aI5b-Rest	A5c	aI5c	A6-8	3'	Genomabschnitt
18	690	24	889	473	67	$18S^{A}$ (2161b)

Exzision der 11S-RNA = aI5c (889b) :

5'	aI5b-Rest	A5c	A6-8	3'	Genomabschnitt
18	690	24	473	67	13,5S (1272b)

Ausdehnung der Deletion der Gruppe A :



(Die Zahlenangaben beziehen sich auf eigene Sequenzdaten und auf veröffentlichte Werte von Bonitz et al. 1980 und Hensgens et al. 1983)

Neben Proteinen sind für die mitochondriale Intronexzision vor allem auch Sekundär- und Tertiärstrukturen der RNA wichtig. Mittels Computeranalysen konnte für eine Reihe von RNAs von Introns verschiedener Zellorganellen Sekundärstrukturen berechnet werden (Davies et al. 1982; Michel et al 1982; Michel and Dujon 1983; Waring et al. 1983). Dabei kann man zwei Gruppen von strukturähnlichen Introns unterscheiden, zu denen sowohl Introns von Mitochondrien als auch von Chloroplasten gehören. Es scheint die biologische Rolle der zu einer Überstruktur gefalteten RNA zu sein, als Splicing-Substrat zu dienen (de La Salle et al. 1982; Anziano et al. 1982; Weiss-Brummer et al. 1983). Interessanterweise finden sich sehr ähnliche Auffaltungen am 3'-Ende der 10S-RNA, der 11S-RNA, der 19S-RNA und der hier untersuchten 19,2S-RNA. Da der vermutliche Splicepoint und der Deletionsendpunkt der Deletionsgruppe B an der gleichen Stelle liegen, kann die von Michel et al. 1982 beschriebene Sekundärstruktur der RNA dieses Introns gebildet werden (Abb. 25). Auch diese mögliche Voraussetzung für das Splicing des Introns aI1 ist also erfüllt. Die oben genannten Argumente und die Ergebnisse der eigenen Arbeit lassen den Schluß zu, daß vor allem die Sequenz des Introns aI1 selbst für seine eigene Exzision von Bedeutung ist. Das Intron aI1 kann also auch, ohne daß das Exon A2 anschließend vorhanden ist, exzisiert und zirkularisiert werden. Seine Exzision ist somit unabhängig von allen weiteren Sequenzen nach Exon A2 bis Intron 5b-Rest, sofern diese innerhalb des deletierten Bereiches der Deletionsgruppe B liegen. Diese Beobachtung wird bestätigt durch eine Transkriptanalyse an einer Deletionsmutante des Stammes D273-10B, der ebenfalls Exon A2 und Sequenzen bis Intron 5c fehlen (Hensgens et al. 1984).

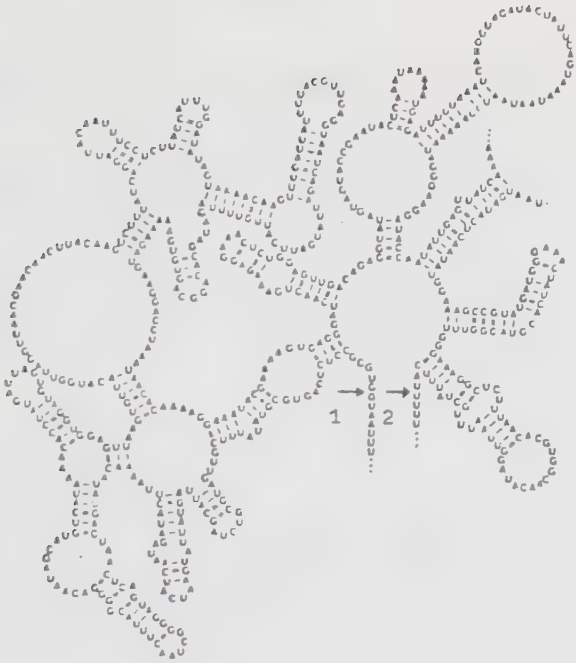


Abb. 25:

Sekundärstruktur des Introns aI1 des OXI3-Gens. Die beiden Pfeile kennzeichnen die vermutlichen Splicepoints des ersten Introns. (Michel et al. 1982). Der Pfeil 2 zeigt den Endpunkt der untersuchten Deletionen der Gruppe B. Dabei ist auffallend, daß Splicepoint und Deletionsendpunkt an gleicher Stelle liegen. Der Vorgang der zur Entstehung der Deletionsgruppe B geführt hat, fand also an einer Exon/Intron Grenze statt.

Die Exzision der oben genannten 19,2S-RNA mit einer Länge von 2450 Nukleotiden ergibt ein Teiltranskript der Größe: 5301 - 2450 = 2851 (N). Dieser Zahlenwert entspricht einer 20S-RNA. Sie wurde mit DNA-Proben sowohl des 5'-Teils als auch des 3'-Teils des OXI3-Gens nachgewiesen.

5'L	A1	aI1	aI5b-Rest	A5c	aI5	A6/7/8	3'T	29S
540	168	2450	690	24	889	473	67	(N)

Exzision als 19,2S-RNA

Im folgenden werden die Daten der RNA-Analysen und der Sequenzierung der Deletionen als Rechengrundlage benutzt, um die Zusammensetzung aller nachgewiesenen Transkripte zu erklären. Da am OXI3-Gen keine lineare Progression der Intronexzision erfolgt, ist es möglich, daß auch die 11S-RNA als erste aus dem Gesamt-Precursor exzisiert wird. Es wurden auch tatsächlich die dadurch möglichen RNA-Stufen auf den Blots nachgewiesen.
5301 (Precursor) - 889 (11S) = 4412 (26S) (N).

Sequenzen aus dem Intron 5b-Rest hybridisieren stark mit der 20S und der 16,5S-RNA. Eine RNA, die kleiner als 16,5S ist und die als Splice-Produkt dieser RNA-Spezies anzusehen wäre, trat nicht auf. Das Intron 5b-Rest kann aus der 16,5S-RNA somit nicht exzisiert werden oder ein eventuelles Splice-Produkt ist wegen seiner geringen Größe im Gel nicht nachweisbar oder wird schnell abgebaut.

Problematisch ist es, die Zusammensetzung der auch auftretenden 18S-RNA der Deletionsmutanten zu deuten, da diese RNA-Spezies in den Hybridisierungen mit Fragmenten des 5'-Teils des Deletionsgenoms von der 19,2S-RNA ganz oder teilweise überdeckt wird. Auf jeden Fall besteht dieses Transkript aus dem 3'-Abschnitt des Genoms ab Exon A5c. Der 5'-Anteil läßt sich aber aus der Gesamtlänge der 18S und den verbliebenen Genomteilen errechnen (siehe Abb. 26).

4. Zusammensetzung der Transkripte der Deletionsmutanten der Gruppe B der OXI3-Region

Addiert man die Längen der Exons und Introns, die in den Transkripten der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Deletionsmutanten identifiziert wurden, so ergibt sich das auf der folgenden Seite dargestellte, schematisierte Blockbild. Die exakte Berechnung der Moleküllängen der RNA und deren Zusammensetzung sollte die Aufstellung eines Prozessierungsschemas ("Pathway")ermöglichen. Das Auftreten einer 23S-RNA läßt sich durch die Exzision des Restintrons 5b aus der 26S-RNA erklären. Alle anderen denkbaren Zerlegungs- und Verknüpfungsvorgänge der im Schema (Abb.26) aufgeführten Teiltranskripte führen zu Transkriptlängen, die erheblich von den identifizierten RNA-Molekülgrößen abweichen. Die Kombination aus dem Nachweis der Zusammensetzung der Teiltranskripte durch spezifische Fragmente in den Northern Blots und die ergänzende Berechnung der möglichen Neuverknüpfungen der RNA-Moleküle führt zu dem Prozessierungsverlauf,der im Schema auf Seite 93 angegeben ist (Abb. 27).

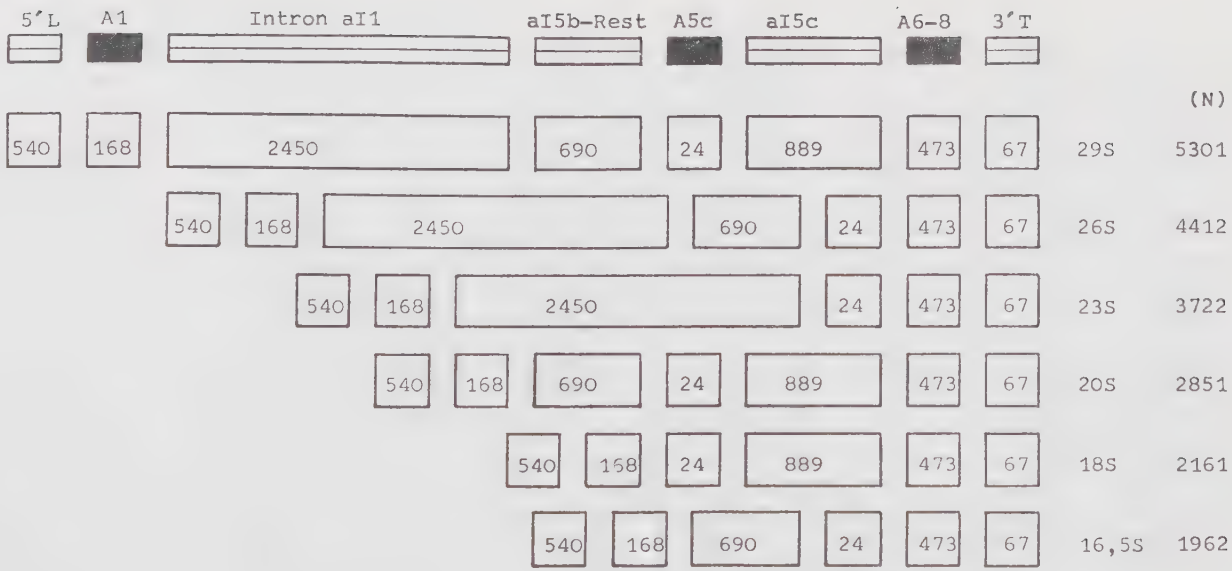


Abb. 26:

Zerlegung der Transkripte von Deletionsmutanten der Gruppe B

Schematische Darstellung (nicht maßstabsgerecht)

■ = Exon ▭ = Intron

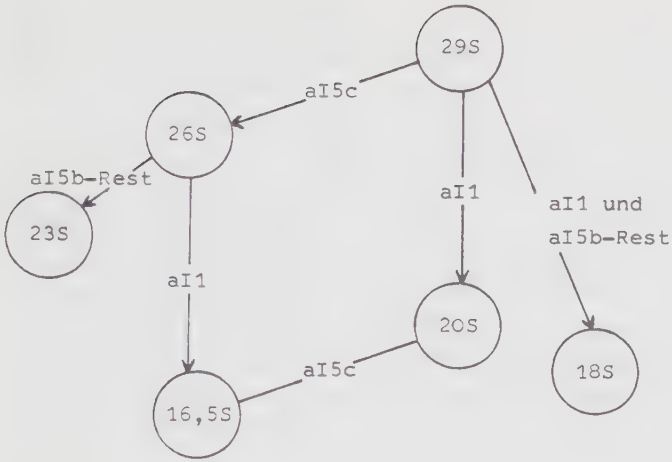


Abb. 27: Prozessierungsverlauf der Teiltranskripte von Deletionsmutanten der Gruppe B.
Die Zahlen in den Kreisen bezeichnen die Prozessierungsstufen. Die Bezeichnungen in den Linien stellen die exzisierten Introns dar. Das Schema ist aus den auf den Autoradiogrammen identifizierten Prozessierungsstufen zusammengestellt (siehe Abb. 26).

Zusammenfassend kann man sagen, daß die untersuchten Deletionsmutanten also ein gegenüber dem Wildtyp vereinfachtes Teiltranskriptmuster aufweisen. Deren Längen zeigen aber, daß auch in diesen Deletionsmutanten eine Prozessierung von höheren Vorstufen zu niedrigeren Transkripten erfolgt. Die Zusammensetzung der untersuchten Teiltranskripte zeigt, daß auch ein "Splicing" der restlichen in den Deletionen noch vorhandenen Introns möglich ist. Dabei werden auch Teile, die im Wildtyp weit voneinander entfernt sind, in den Transkripten der Deletionen miteinander verknüpft. Hensgens et al. (1984) beobachteten bei einer Deletion des Stammes 273-10B (kurzer Stamm) einen ähnlichen Vorgang. Dort wurde ein Teil des Exons A2 an einen Teil des Introns AI5 geknüpft.

5. Sequenzbesonderheiten im Bereich des Introns 5b-Rest

Der Mechanismus des Splicing der mitochondrialen Introns ist noch an keinem Beispiel vollständig geklärt. Die Introns der Organellen unterscheiden sich in dieser Hinsicht von denen der proteinkodierenden Gene im Kern der höheren Eukaryonten deutlich. Sie erfüllen nicht die GT.....AG Regel (Breathnach et al. 1978), welche für die Kern-Introns bedeutet, daß die Sequenzen der Exon/Intron-Überlängen allein für den Exzisionsmechanismus entscheidend sind (Cech 1983).

Das Actin-Gen im Hefe-Kerngenom nimmt allerdings eine Sonderstellung ein. Hier wurde eine Sequenz zwischen den Nukleotiden 35 und 90 (TACTAAC) vor dem 3'-Ende innerhalb des Introns entdeckt, welche zusätzlich zu den Grenzen dieses Introns für ein korrektes Splicing nötig ist (Langford et al. 1984).

Demgegenüber beeinflussen in den Mitochondrien Mutationen innerhalb der Introns das korrekte Splicing wesentlich mehr, als solche direkt an den Exon/Intron-Berührungsstellen ("joints") (de La Salle et al. 1982; Jacq et al. 1982; Mahler et al. 1982; Netter et al. 1982; Schmelzer et al. 1982; Weiss-Brummer et al. 1982). Beispielsweise wurde festgestellt, daß die Basenfolge am 3'-Ende des COB Intron 1 auch in anderen Introns konserviert ist, woraus geschlossen wurde, daß diese Basenfolge eine wichtige Rolle für das RNA-Splicing spielt (Schmelzer et al. 1982). Ein Versuch einer Erklärung für das Zustandekommen der Exzision des Restintrons 5b der Deletionsmutanten Gruppe B wäre die Verwendung einer Ersatzsequenz für den deletierten 5'-Teil des Introns 5b, welche dem direkt vorausgehenden Intron 1 entnommen werden könnte. Vergleicht man nun im Wildtyp die Sequenz des Anfangs von Intron 5b mit dem Ende von Intron 1, so findet sich tatsächlich eine Sequenzhomologie, welche als Ersatzerkennungssequenz für das Splicing dienen könnte (siehe nachfolgende Abbildung).

```
        Sequenz einer
        Deletionsmutanten                 Nahtstelle
        der Gruppe B
                                  Intron aI1 | Intron 5b-Rest
DEL        ....G GTTAATTT GCTATTTCAT|AAAT....
WT         ....T| ATTAATTT AATA.....
        Exon 5b   Intron 5b

        Wildtypsequenz
```

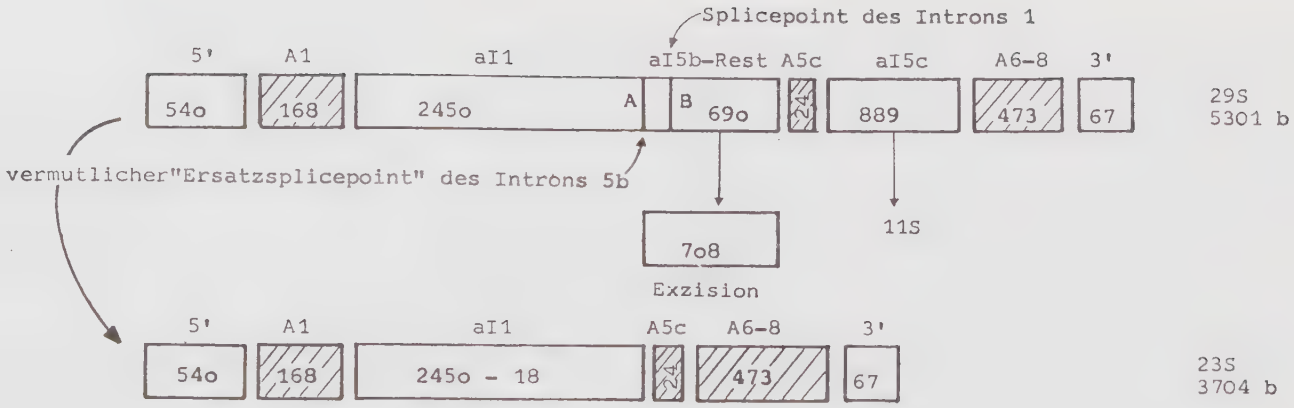


Abb. 28: Möglichkeiten der Intronexzisionen bei Verwendung des Splicepoints von Intron 1 oder eines "Ersatzsplicepoints" für das Intron 5b.

▨ = Exon □ = Intron

Darüberhinaus weisen aber eine Reihe von Untersuchungen darauf hin, daß intramolekulare Hybridstrukturen für das Splicing der mitochondrialen Introns relevant sind, worauf oben bei der Diskussion der Exzision der 19,2S-RNA schon näher eingegangen wurde. Im Falle des hier betrachteten Introns 5b-Rest der Deletionsmutanten Gruppe B läßt sich eine solche Hybridstruktur unter Verwendung eines "inverted repeat" am Anfang und Ende des Introns bilden, wodurch die Enden soweit angenähert werden könnten, daß eine Exzision des gesamten Introns ermöglicht wird (siehe Abb. 29).

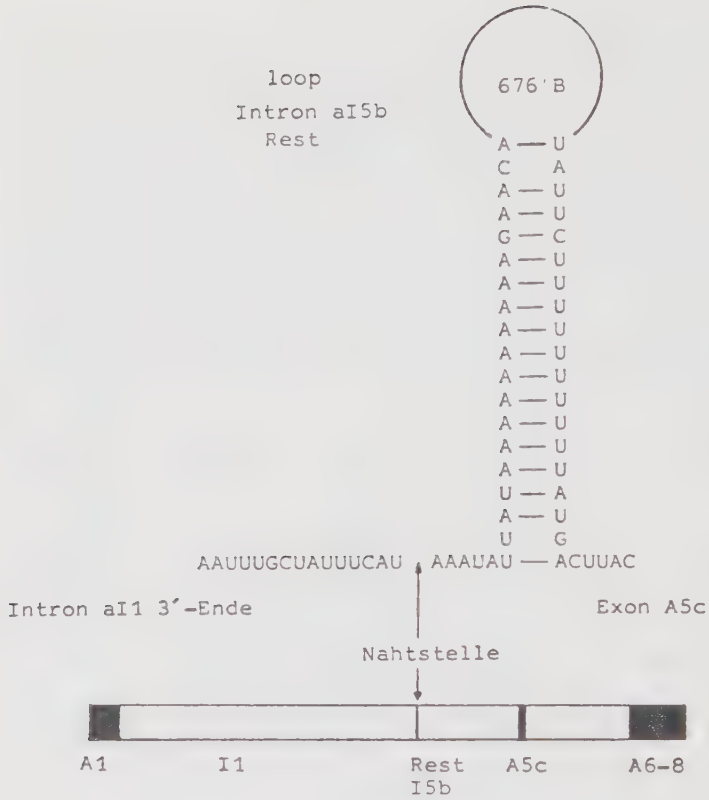


Abb. 29:
Mögliche Sekundärstruktur durch Paarung komplementärer Sequenzen innerhalb des Restintrons 5b der Deletionsgruppe B, wodurch eine Zusammenführung der Enden des Introns erreicht wird.

6. Sequenzbesonderheiten an den Deletionsendpunkten der Gruppe B

In der OXI3-Region findet man, verglichen mit anderen Regionen des mitochondrialen Genoms, mit besonderer Häufigkeit Deletionen. Von allen induzierten mit⁻-Mutanten sind dies ca. 20 %. Von Mutanten des OXI1-Gens weisen nur 3 % und von den Mutanten der COB-Region lediglich 1,5 % Deletionen auf. Das OXI3-Gen "verliert" also leichter als andere Regionen größere Stücke seiner DNA. Auffallend ist, daß sich diese internen Deletionsenden gehäuft an 4 definierten Stellen des Gens finden. Bruckner (1984) hat mit Hilfe genetischer Analysen diese Endpunkte zwischen folgenden Clustern festgestellt: C 18/19 (45 %); C 24/25 (10 %); C 22/23 (7,5 %); C 7/8 (6,5 %) (vergleiche Abb. 11). All diese Mutanten stammten aus verschiedenartigen Induktionsansätzen. Die genetische Kartierung wurde durch eine physische Lokalisation der Deletionsendpunkte mittels Restriktionskartierung ergänzt. Unter anderem wurde das gruppenweise Auftreten von deletionsspezifischen Fusionsfragmenten gleicher Größenordnung festgestellt. Aufgrund dieser Daten konnten die Deletionsklassen in drei übergeordnete Gruppen (A/B/C) eingeteilt werden. Im folgenden hatten die Transkriptanalysen zusätzlich Beweise für die Gleichartigkeit der untersuchten Deletionsmutanten innerhalb einer Gruppe gebracht. Die Summe dieser Beobachtungen, insbesondere die Gleichartigkeit trotz unabhängiger Mutagenese und die Häufung von Deletionen bei Bevorzugung bestimmter Endpunkte, ließen die Vermutung aufkommen, daß diesen Erscheinungen ein bestimmter Mechanismus der Deletionsentstehung zugrunde liegt.

Zu diesem Zweck war an einem Vertreter der Gruppe B eine Sequenzanalyse durchgeführt worden, die es ermöglichte, die

Basenfolge an der Nahtstelle exakt zu analysieren. Ein für die Deletionsentstehung allgemein postulierter Mechanismus ist dem der illegitimen Rekombination ähnlich (Sor & Fukuhara 1983). Dabei führen homologe Sequenzen an den Deletionsendpunkten zur Exzision des dazwischenliegenden Genoms. Albertini et al. (1982) hatten bei Untersuchungen an E. coli festgestellt, daß die Länge von "direct repeats" im Genom in direktem Zusammenhang mit der Häufigkeit von dazwischenliegenden Deletionen steht. Im Gegensatz dazu finden sich auffallende Strukturen bei der Deletionsgruppe B der OXI3-Region in Form von zwei "inverted repeats" vor den beiden Endpunkten des exzisierten Bereichs (Abb.30). Man könnte sich vorstellen, daß Enzyme diese Strukturen erkennen und damit die Schnittstellen für die Exzision bestimmen.

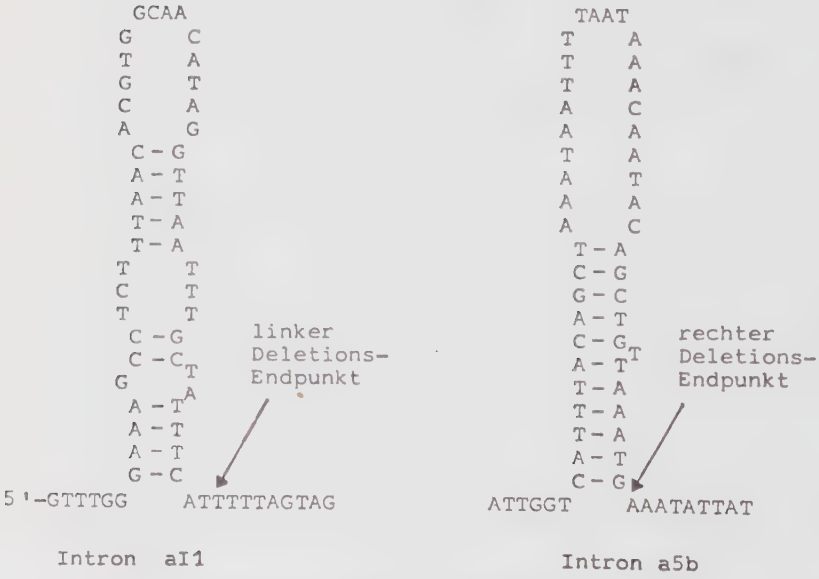


Abb. 30: "inverted repeats" (Einzelheiten im Text)

Eine mögliche Erklärung für das Fehlen von signifikanten Sequenzhomologien an den Deletionsendpunkten wäre darin zu sehen, daß der Deletionsvorgang in mehreren aufeinanderfolgenden Stufen verläuft. Homologien der Endpunkte der Zwischenstufen wären im Endstadium ja deletiert und somit nicht mehr erkennbar.
Schließlich besteht noch die Möglichkeit, daß der Deletionsbildungsprozeß nicht so sehr von Sequenzhomologien, sondern von der Art der Mutagenese gesteuert wird. Untersuchungen der Bildung von rho$^-$-Mutanten haben gezeigt, daß an den Exzisionsstellen von spontan entstandenen rho$^-$-Mutanten "repeats" von 9-23 bp vorkommen (Bernardi et al. 1980), während EB-induzierte Stämme deutlich kürzere homologe Sequenzen von 3-4 bp aufweisen (Sor & Fukuhara 1983). Möglicherweise ist die Art der Sequenzspezifität der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Deletionen aufgrund des Modus der Mutagenese nicht mehr erkennbar.

Als weiterer interessanter Aspekt der Deletionsentstehung sollen noch neuere Ergebnisse von Slonimski und Mitarbeitern erwähnt werden. Mutanten der COB-Region,in denen die Exzision der RNA der Introns bI1, bI2 und bI3 gestört war, revertierten mit einer Häufigkeit von 10^{-8} bis 10^{-9} zum WT, indem diese drei Introns deletierten. Hier finden sich also Deletionsereignisse an Exon/Intron-Grenzen, wie dies in ähnlicher Weise bei Deletionen der OXI3-Region gefunden wurde.

7. Abschließende Betrachtungen zur Mosaikstruktur des OXI3-Gens

Im folgenden sollen die Ergebnisse der Transkriptuntersuchungen an Punktmutanten der OXI3-Region zusammengefaßt werden und zur Mosaikstruktur dieses Gens in Beziehung gesetzt werden.

Haid et al. (1979) hatten gezeigt, daß in der COB-Region bestimmte Mutanten-Phänotypen typisch für Exon-Abschnitte und andere typisch für Intron-Abschnitte dieses Gens sind. Für Mutanten der OXI3-Region konnten von Bruckner (1984) sehr ähnliche Verhältnisse festgestellt werden. Seine Ergebnisse basieren auf genetischen Tests und spektralen Untersuchungen der Cytochrom-c-Oxidase. Es fiel auf, daß beispielsweise temperatursensible und Leaky-Mutanten oft deutlich geclustert sind. Diese wurden als Intron-Mutanten interpretiert. OXI3-Mutanten, die das Cytochrom aa_3 voll zeigen (teilweise mit Shift des Absorptionsmaximums), wurden exonischen Bereichen zugeordnet. Der daraus resultierende Mosaikaufbau des OXI3-Gens ist in Abb. 31 auf Balken A dargestellt. Diese Ergebnisse ließen noch große, nicht zuordenbare Bereiche offen. In der vorliegenden Arbeit wurde nun eine weiter verfeinerte Korrelation zwischen Mutationsort und Mosaikaufbau erreicht. Zu diesem Zweck wurden die Ergebnisse der Transkriptanalysen in Kombination mit Proteinuntersuchungen an mit^-_{oxi3} Mutanten herangezogen und mit den in der COB-Region gewonnenen Erkenntnissen verglichen. Die Transkripte von Punktmutanten des COB-Gens aus Abschnitten, die für das Apocytochrom b kodieren, zeigten ein vom Wildtyp nicht unterscheidbares Muster, während mit^-_{cob} Mutanten aus Introns zur Anreicherung höhermolekularer Transkripte und zur quantitativen Verminderung oder dem völligen Fehlen des reifen Messengers führten (Schmelzer et al. 1981).

Abb.31: Mosaikaufbau der OXI 3 Region.

Zusammenstellung der Struktur dieses Gens aus den Daten der genetischen(A) Analysen (Bruckner 1984) und den Ergebnissen der eigenen Transkriptuntersuchungen dieser Region (B und C)

■ = wahrscheinliche Exons ; □ = wahrscheinliche Introns

▤ = nicht zuordenbare Bereiche ; ●/o Position der Exon/Intron-Mutanten.

(Weitere Einzelheiten und Erläuterungen im Text)

Auf der Basis der oben aufgeführten Beobachtungen konnte für mit^{-}_{oxi3} Mutanten eine Zuordnung zur Mosaikstruktur dieses Gens erreicht werden. Die Leaky-Mutanten zeigten eine Verminderung der Menge des reifen Messengers in Verbindung mit einer Anhäufung von 23S RNA bzw. 30S RNA, was eine Störung des Processing darstellt und den Verdacht, daß es sich hierbei um Intron-Mutanten handelt, bestätigte. Die Positionen der mit^{-}_{oxi3} Mutanten, die ein dem Wildtyp entsprechendes Transkriptmuster zeigten und deshalb als Exon-Mutanten definiert wurden, sind in der Abbildung S.103 als schwarze Punkte (•) gekennzeichnet. Auf diese Weise konnten bisher nicht zuordenbare Bereiche in die Kartierung des Mosaikaufbaus der OXI3-Region miteinbezogen werden. Diese erweiterte Anordnung der unterschiedlichen funktionellen Abschnitte des Gens ist im Balken C (Abb. 31) dargestellt.

E. Zusammenfassung

Gegenstand der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit war die OXI3-Region der mitochondrialen DNA von Saccharomyces cerevisiae.

1.) Es wurde eine Verfeinerung der Korrelation zwischen Mutationsort und Mosaikstruktur des OXI3-Gens unternommen. Zu diesem Zweck wurden die Ergebnisse der Transkriptanalysen von mit$^-$-Punktmutanten und Leaky-Mutanten herangezogen, welche eine genauere Eingrenzung der Exon- und Intronbereiche zuließen. Ferner wurden definierte Prozessierungsstufen der Reifung der Messenger-RNA nachgewiesen. Proteinuntersuchungen an den gleichen Mutanten in Kombination mit Transkriptstudien erlaubten die Schlußfolgerung, daß es sich hier um Defekte der Assemblierung der Untereinheit I in den Cytochrom-c-Oxidase Komplex handelt.

2.) Ergebnisse der Hybridisierung einer OXI3 DNA-Probe mit RNA von mit Chloramphenicol behandelten Zellen bewies die Abhängigkeit der Reifung der Transkripte dieser Region von mitochondrialen Proteinen. Dabei wurden mRNA-Vorstufen nachgewiesen, die aufgrund ihres Molekulargewichtes weit über die Länge der OXI3-Region hinausgehen und deshalb andere Teile des mitochondrialen Genoms enthalten müssen. Dafür in Frage kommende Bereiche sind die Gene aap1 und OLI2. Derartige überlange Transkripte wurden auch in der RNA der untersuchten Deletionsmutanten nachgewiesen.

3.) Die Verwendung von mit$^-$-Deletionsmutanten, welche große Teile der Region verloren haben, erlaubte die gesonderte Betrachtung der Prozessierungsvorgänge an einer verminderten Zahl von Exons und Introns. Die Deletionsmutanten zeigten

ein gegenüber dem Wildtyp vereinfachtes Transkriptmuster, dessen definierte Längen aber darauf hinwiesen, daß auch in allen untersuchten Deletionen eine Prozessierung von höheren Vorstufen zu niedrigeren Reifungsschritten erfolgte.

4.) Um eine exakte Rechengrundlage für die Zusammensetzung und Lage der beobachteten Transkripte zu erhalten, wurde die Nahtstelle der Deletionsgruppe B sequenziert. Auffallend ist, daß der "Splicepoint" am 3'-Ende des Introns aI1 an exakt der gleichen Stelle liegt, wie der Deletionsendpunkt 2, also an einer Exon/Intron-Grenze.

5.) Die aus den experimentellen Daten und Berechnungen der retenierten Bereiche erschlossenen Zusammensetzungen der nachgewiesenen Prozessierungsstufen zeigten, daß auch in den Deletionsmutanten noch ein Splicing der verbliebenen Introns möglich ist. Dabei werden RNA-Teile, welche im Wildtyp weit voneinander entfernt sind, in diesen Prozessierungsstufen miteinander verknüpft.

6.) Häufung und Gleichartigkeit der Deletionsmutanten der OXI3-Region trotz unabhängiger Mutagenese lassen einen sequenzspezifischen Entstehungsmodus für sie vermuten. Eine für die Gewinnung von Restriktionsfragmenten durchgeführte rho$^-$-Induktion ergab weitere Bestätigungen, daß es in der OXI3-Region Bereiche bevorzugter Retention von Genabschnitten gibt.

F. Literaturverzeichnis

Abelson, J.:
RNA processing and the intervening sequence problem.
Ann. Rev. Biochem. 48, 1035-1069 (1979)

Albertini, A.M.; Hofer, M.; Calos, M.P. & Miller, J.H.:
On the formation of spontaneous deletions:
The importance of short sequence homologies in the generation of large deletions.
Cell 29, 319-328 (1982)

Alwine, J.C.; Kemp, D.J.; Stark, G.R.:
Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyl-oximethyl-paper and hybridization with DNA probes.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 74, 5350-5354 (1977)

Anderson, S.; Bankier, A.T.; Barrell, B.G.; de Bruijn, M.H.L.; Coulson, A.R.; Drouin, J.; Eperon, I.C.; Nierlich, D.P.; Roe, B.A.; Sanger, F.; Schreier, P.H.; Smith, A.J.H.; Staden, R. and Young, I.G.:
Sequence and organization of the human mitochondrial genome.
Nature 290, 457-465 (1981)

Anziano, P.Q.; Hanson, D.K.; Mahler, H.R.; Perlman, P.:
Cell 30, 925-932 (1982)

Arnberg, A.C.; van Ommen, G.-J.B.; Grivell, L.A.; van Bruggen, E.F.J.; Borst, P.:
Some yeast mitochondrial RNAs are circular.
Cell 19, 313-319 (1980)

Bailey, J.M. and Davidson, N.:
Methylmercury as a reversible denaturing agent for agarose gel electrophoresis.
Anal. Biochem. 70, 75-85 (1976)

Bechmann, H.; Haid, A.; Schmelzer, C.; Schweyen, R.J. and Kaudewitz, F.:
Processing of the mRNA for apocytochrome b in yeast depends on a product encoded by an intervening sequence.
In: Organization and expression of the mitochondrial genome (Kroon, A.M. and Saccone, C. eds.)
Elsevier/North-Holland Biomedical Press,
pp. 173-177 (1980)

Bechmann, H.; Haid, A.; Schweyen, R.J.; Mathews, S.; Kaudewitz, F.:
Expression of the 'split gene' COB in yeast mtDNA. Translation of intervening sequences in mutant strains.
J.Biol.Chem. 256, 3525-3531 (1981).

Bernardi, G.; Baldacci, G.; Bernardi, G.; Faugeron-Fonty, G.; Gaillard, C.; Goursot, R.; Huyard, A.; Mangin, M.; Marotta, R. & De Zamaroczy, M. :
The petite mutation: Excision sequences, replication origins and suppressivity.
In: The organization and expression of the mitochondrial genome (Kroon, A.M. & Saccone, C., Eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 21-31 (1980)

Bibb, M.J.; van Etten, R.A.; Wright, C.T.; Walberg, M.W.; Clayton, D.A.:
Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA.
Cell 26, 167-180 (1981)

Böker, E.; Kaudewitz, F.; Richmond, K.V.; Schweyen, R.J.; Thomas, D.Y.:
The effect of glucose on the number of mitochondrial genomes participating in mitochondrial crosses.
In: Genetics, Biogenesis and Bioenergetics of Mitochondria (Bandlow, W.; Schweyen, R.J.; Thomas, D.Y.; Wolf, K.; Kaudewitz, F.; eds.) de Gruyter/Berlin, 99-115 (1976)

Bonitz, S.G. & Tzagoloff, A.:
Assembly of the mitochondrial membrane system: Sequences of yeast mitochondrial tRNA genes.
J.Biol.Chem. 255, 9075-9081 (1980)

Bonitz, S.G.; Coruzzi, G.; Thalenfeld, B.E.; Tzagoloff, A. and Macino, G.:
Assembly of the mitochondrial membrane system: Structure and nucleotide sequence of the gene coding for subunit I of yeast cytochrome oxidase.
J.Biol. Chem. 255, 11927-11941 (1980b).

Borst, P.:
Mitochondrial nucleic acids.
Ann. Rev. Biochem. 41, 333-376 (1972)

Borst, P. and Grivell, L.A.:
The mitochondrial genome of yeast.
Cell 15, 705-723 (1978)

Borst, P. and Grivell, L.A.:
Small is beautiful - portrait of a mitochondrial genome.
Nature 290, 443-444 (1981)

Review Borst-Grivell:
Nature 285, 439-440 (1981)

Breathnach, R.; Benoist, C.; O'Hare, K.; Gannon, F. and Chambon, P.:
The ovalbumin gene: evidence for a leader sequence in mRNA and DNA sequences at the exon-intron boundaries.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75, 4853-4857 (1978)

Breathnach, R. and Chambon, P.:
Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins.
Ann. Rev. Biochem. 50, 349-383 (1981)

Bruckner, H.P.:
Dissertation, Universität München 1984

Brunori, M. and Wilson, M.T.:
Cytochrome oxidase.
TIBS, 295-299 (August 1982)

Cabral, F., Solioz, M., Deters, D., Rudin, Y., Schatz, G., Clavilier, L., Groudinski, O., Slonimski, P.P.:
Effect of mitochondrial mutations on Cytochrom-C-Oxidase in Yeast.
In: Mitochondria 1977
(Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K., Kaudewitz, F., eds.)
Berlin: De Gruyter, pp. 401-414 (1977)

Carignani, G., Dujardin, G. & Slonimski, P.P.:
Petite deletion map of the mitochondrial OXI3 region in Saccaromyces cerevisiae.
Mol. Gen. Genet. 167, 301-308 (1979)

Carignani, G.; Groudinsky, O.; Frezza, D.; Schiavon, E.; Bergantino, E. and Slonimski, P.P.:
An mRNA Maturase is Encoded by the First Intron of the Mitochondrial Gene for the Subunit I of Cytochrome Oxidase in S. cerevisiae.
Cell 35, 733-742 (1983) (Part 2)

Cech, T.R.:
RNA Splicing: Three Themes with Variations.
Cell 34, 713-716 (1983)

Coruzzi, G.; Bonitz, S.; Thalenfeld, B.E. & Tzagoloff, A.:
Assembly of the mitochondrial membrane system: Analysis of the nucleotide sequence and transcripts in the oxi1 region of yeast.
J.Biol. Chem. 256, 12780-12787 (1981)

Crick, F.:
Split genes and RNA splicing. (Review)
Science 204, 264-271 (1979)

Davies, R.W.; Waring, R.B.; Ray, J.A.; Brown, G.A.; and Scazzocchio, C.:
Making ends meet: a model for RNA splicing in fungal mitochondria.
Nature 300, 719-724 (1982)

De La Salle, H.; Jacq, C. and Slonimski, P.P.:
Critical sequences within mitochondrial introns: pleiotropic mRNA maturase and cis-dominant signals of the box intron controlling reductase and oxidase.
Cell 28, 721-732 (1982)

Denhardt, D.T.:
A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 23, 641-646 (1966)

Deutsch, J.; Dujon, B.; Netter, P.; Petrochilo, E.; Slonimski, P.P.; Bolotin-Fukuhara, F. & Coen, D.:
Mitochondrial genetics VI. The petite mutation in Saccharomyces cerevisiae: interrelations between the loss of the rho$^+$ factor and the loss of the drug resistance mitochondrial genetic markers.
Genetics 76, 195-219 (1974)

Douglas, M. and Butow, R.A.:
Variant forms of mitochondrial translation products in yeast: Evidence for location of determinants on mitochondrial DNA.
Proc. Nat. Acad. Sci. 73, 1083-1086 (1976)

Dujon, B.:
Mitochondrial genetics and functions. In: The molecular biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae.
Cold Spring Harbor Laboratories, 505-635 (1981)

Eccelshall, T.R.; Needleman, R.B.; Storm, E.M.; Buchferer, B. and Marmur, J.:
A temperature-sensitive yeast mitochondrial mutant with altered Cytochrome c Oxidase subunit I.
Nature 273, 67-70 (1978)

Faye, G; Fukuhara, H.; Grandchamp, C.; Lazowska, J.; Michel, F.; Casney, I.; Getz, G.S.; Locker, J.; Rabinowitz, M.; Bolotin-Fukuhara, M.; Coen, D.; Deutsch, J.; Dujon, B.; Netter, P. and Slonimski, P.P.:
Mitochondrial nucleic acids in petite colonie mutants: Deletion and repetition of genes.
Biochimie 55, 779-792 (1973)

Faye, G.; Kujawa, C. and Fukuhara, H.:
Physical and genetic organization of petite and grande yeast mitochondrial DNA. IV. In vivo transcription products of mitochondrial DNA and localization of 23S ribosomal RNA in petite mutants of Saccharomyces cerevisiae.
J.Mol. Biol. 88, 185-203 (1974)

Faye, G.; Dennebouy, N.; Kujawa, C. and Jacq, C.:
Inserted sequence in the mitochondrial 23S ribosomal RNA gene of the yeast S. cerevisiae.
Mol. Gen. Genet. 168, 101-109 (1979)

Faye, G. and Simon, M.:
Analysis of a Yeast Nuclear Gene Involved in the Maturation of Mitochondrial Pre-Messenger RNA of the Cytochrome Oxidase Subunit I.
Cell 32, 77-87 (1983)

Foury, F.:
Endonucleases in yeast mitochondria. Apurinic and manganese-stimulated deoxyribonuclease activities in the inner mitochondrial membrane of Saccharomyces cerevisiae.
Eur. J. Biochem. 124, 253-259 (1982)

Gaillard, C.; Strauss, F. & Bernardi, G.:
Excision sequences in the mitochondrial genome of yeast.
Nature 283, 218-220 (1979)

Gilbert, W.:
Why genes in pieces?
Nature 271, 501 (1978)

Goursot, R.; Mangin, M. & Bernardi, G.:
Surrogate origins of replication in the mitochondrial genomes of ori° petite mutants of yeast.
EMBO J. 6, 705-711 (1982)

Grivell, L.A.; Reijinders, L. and DeVries, H.:
Altered mitochondrial ribosomes in a cytoplasmic mutant of yeast.
FEBS letters 16, 159-163 (1971)

Grivell, L.A. & Moorman, A.F.M.:
A structural analysis of the OXI3 region on yeast mtDNA.
In: Mitochondria 1977: Genetics and Biogenesis of mitochondria (Bandlow, W.; Schweyen, R.J.; Wolf, K. & Kaudewitz, F., Eds.)
De Gruyter, Berlin, pp. 371-384 (1977)

Grivell, L.A.; Arnberg, A.C.; Boer, P.H.; Borst, P.; Bos, J.L.; Van Bruggen, E.F.J.; Groot, G.S.P.; Hecht, N.B.; Hensgens, L.A.M.; Van Ommen, G.J.B. & Tabak, H.F.:
Transcripts of yeast mitochondrial DNA and their processing.
In: ICN-UCLA Symposia on molecular and cellular biology: Extrachromosomal DNA.
(Cummings, D.J.; Borst, P.; Dawid, I.B.; Weissman, S.M. & Fox, C.F., Eds.) Vol. 15
Academic Press, New York, pp. 305-324 (1979)

Grivell, L.A.; Arnberg, A.C.; Hensgens, L.A.M.; Roosendaal, E.; Van Ommen, G.J.B. and Van Bruggen, E.F.J.:
Split genes on yeast mitochondrial DNA: Organization and expression.
In: The Organization and Expression of the Mitochondrial Genome (Kroon, A.M. and Saccone, C., eds.)
Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 37-49 (1980)

Grivell, L.A.; Hensgens, L.A.M.; Osinga, K.A.; Tabak, H.F.; Arnberg, A.C.; Boer, P.H.; Crusius, J.B.A.; Van der Laan, J.C.; De Haan, M.; Van der Horst, G. & Evers, R.F.:
RNA processing in Yeast mitochondria. In: Mitochondrial genes (Slonimski, P.P.; Borst, P. & Attardi, G., Eds.)
Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York, pp. 225-239 (1982)

Grivell, L.A.:
In: Mitochondrial Genes (Slonimski, P.; Borst, P. and Attardi, G., eds.)
pp. 225-239 (1982), Cold Spring Harbor Laboratory

Grivell, L.A.:
Mitochondrial DNA.
Scient. Amer. 248, 60-73 (1983)

Grivell, L.A.:
Mitochondrial gene expression.
In: Nucleo-Mitochondrial Interactions (Schweyen, R.J.; Wolf, K. and Kaudewitz, F., Eds.)
De Gruyter, Berlin (1984)

Haid, A.; Schweyen, R.J.; Bechmann, H.; Kaudewitz, F.; Solioz, M. and Schatz, G.:
The mitochondrial COB region in yeast codes for apocytochrome b and is mosaic.
Eur. J. Biochem. 94, 451-464 (1979)

Haid, A.; Grosch, G.; Schmelzer, C.; Schweyen, R.J. and Kaudewitz, F.:
Expression of the split gene COB in yeast mtDNA. Mutational arrest in the pathway of transcript splicing.
Current Genetics 1, 155-161 (1980)

Halbreich, A.; Pajot, P.; Foucher, M.; Grandchamp, C. & Slonimski, P.P.:
A pathway of cytochrome b mRNA processing in yeast mitochondria: Specific splicing steps and an intron-derived circular RNA.
Cell 19, 321-329 (1980)

Hensgens, L.A.M.; Arnberg, A.C.; Roosendaal, E.; van der Horst, G.; van der Vreen, R.; van Ommen, G.J.B.; Grivell, L.A.:
Variation transcription and circular RNAs of the mitochondrial gene for subunit I of cytochrome c oxidase.
J.Mol.Biol. 164, 35-58 (1983b)

Hensgens, L.A.M.; Bonen, L.; De Haan, M.; Van der Horst, G. & Grivell, L.A.:
Two intron sequences in yeast mitochondrial COX I gene: Homology among URF-containing introns and strain-dependent variation in flanking exons.
Cell 32, 379-389 (1983a)

Hensgens, L.A.M.; Van der Horst, G.; Vos, H.L. and Grivell, L.A.:
RNA processing in yeast mitochondria: characterization of mit⁻ mutants disturbed in the synthesis of subunit I of cytochrome c oxidase.
Current Genetics 8, 457-465 (1984)

Heyting, C.; Meijlink, F.C.P.W.; Verbeet, M.P.; Sanders, J.P.M. and Borst, P.:
Fine structure of the 21S ribosomal RNA region on yeast mitochondrial DNA. I. Construction of the physical map and localisation of the cistron for the 21S mitochondrial ribosomal RNA.
Molec. Gen. Genet. 168, 231-250 (1979)

Heyting, C., & Menke, H.H.:
Fine structure of the 21S ribosomal RNA region on yeast mitochondrial DNA. III. Physical location of mitochondrial genetic markers and the molecular nature of ω .
Molec. Gen. Genet. 168, 279-291 (1979)

12th International Bari Conference on the Organization and Expression of the Mitochondrial Genome.
In: The Organization and Expression of the mitochondrial Genome (Kroon, A.M. and Saccone, C., eds.)
Elsevier/North-Holland, Biomedical Press (1980)

Jacq, C.; Lazowska, J. and Slonimski, P.P.:
Sur un nouveau mécanisme de la régulation de l'expression génétique.
C.R. Acad. Sc. Paris 290, Serie D, 89-92 (1980)

Jacq, C.; Lazowska, J. & Slonimski, P.P.:
Cytochrome b messenger RNA maturase encoded in an intron regulates the expression of the split gene: I. Physical location and base sequence of intron mutations.
In: The organization and expression of the mitochondrial genome (Kroon, A.M. & Saccone, C., Eds.)
Elsevier, Amsterdam, pp. 139-152 (1980)

Jacq, C.; Pajot, P.; Lazowska, J.; Dujardin, G.; Claisse, M.; Groudinsky, O.; de la Salle, H.; Grandchamp, C.; Labouesse, M.; Gargouri, A.; Guiard, B.; Spyridakis, A.; Dreyfus, M.; Slonimski, P.P.:
Role of introns in the yeast cytochrome b gene: cis- and transacting signals, intron manipulation, expression and intergenic communications. In: Mitochondrial genes (Slonimski, P.; Borst, P.;Attardi, G., Eds.)
Cold Spring Harbor Laboratories, 155-183 (1982)

Kotylak, Z. and Slonimski, P.P.:
Fine structure genetic map of the mitochondrial DNA region controlling coenzyme QH_2: cytochrome c reductase.
In: Mitochondria 77- Genetics and Biogenesis of Mitochondria (Bandlow, W.; Schweyen, R.J.; Wolf, K. and Kaudewitz, F., eds.)
Berlin: de Gruyter, 161-172 (1977)

Kreike, J.; Bechmann, H.; Van Hemmert, F.J.; Schweyen, R.J.; Boer, P.H.; Kaudewitz, F. and Groot, G.S.P.:
The identification of apocytochrome b as a mitochondrial gene product and immunological evidence for altered apocytochrome b in yeast strains having mutations in the COB region of mitochondrial DNA.
Eur. J. Biochem. 101, 607-617 (1979)

Lang, B.; Burger, G.; Doxiadis, I.; Thomas, D.Y.; Bandlow, W. and Kaudewitz, F.:
A simple method for the large scale preparation of mitochondria from microorganisms.
Anal. Biochem. 77, 110-121 (1977)

Langford, C.J. and Gallwitz, D.:
Evidence for an intron-contained sequence required for the splicing of yeast RNA polymerase II transcripts.
Cell 33, 519-527 (1983)

Lazowska, J.; Jacq, C. and Slonimski, P.P.:
DNA sequence and organization of the cyt. b gene.
Cell 22, 333-348 (1980)

Lehrach, H.; Diamond, D.; Worney, J.M. and Boedtker, H.:
RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination.
Biochemistry 16, 4743-4751 (1977)

Lerner, M.R.; Boyle, J.A.; Mount, S.M.; Wolin, S.L. and Steitz, J.A.:
Are snRNAs involved in splicing?
Nature 283, 220-224 (1980)

Lewin, A.; Morimoto, R.; Rabinowitz, M.; Fukuhara, H.:
Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNAs of petite mutants of yeast: classification of petites and deletion mapping of mitochondrial genes.
Mol. Gen. Genet. 163, 257-275 (1978)

Lewin, B.:
Alternatives for splicing: Recognizing the ends of introns.
Cell 22, 324-326 (1980)

Locker, J.; Rabinowitz, M. and Getz, G.S.:
Tandem inverted repeats in mitochondrial DNA of petite mutants of S. cerevisiae.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 1366-1370 (1974a)

Locker, J.; Rabinowitz, M. and Getz, G.S.:
Electron microscopic and renaturation kinetic analysis of mitochondrial DNA of cytoplasmic petite mutants of S. cerevisiae.
J. Mol. Biol. 88, 489-507 (1974b)

Macino, G. & Tzagoloff, A.:
Assembly of the mitochondrial membrane system: Sequence analysis of a yeast mitochondrial ATPase gene containing the oli-2 and oli-4 loci.
Cell 20, 507-518 (1980)

Mahler, H.R.; Hanson, D.; Miller, D.; Lin, C.C.; Alexander, N.J.; Vincent, R.D.; Perlman, P.S.:
Regulatory aspects of the mitochondrial biogenesis.
In: idem ref. (59), pp. 513-547 (1978)

Marotta, R.; Colin, Y.; Goursot, R. & Bernardi, G.:
A region of extreme instability in the mitochondrial genome of yeast.
EMBO J. 5, 529-534 (1982)

Maxam, M.A. and Gilbert, W.:
A new method for sequencing DNA.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 560-564 (1977)

Michel, F.; Jacquier, A.; Dujon, B.:
Comparison of fungal mitochondrial introns reveals extensive homologies in RNA secondary structure.
Biochimie 64, 867-881 (1982)

Morimoto, R.; Lewin, A. and Rabinowitz, M.:
Physical mapping and characterization of the mitochondrial DNA and RNA sequences from mit⁻ mutants defective in cytochrome oxidase peptide 1 (OXI3).
Molec. Gen. Genet. 170, 1-9 (1979)

Müller, W.; Gautier, F.:
Interactions of heterochromatic compounds with nucleic acids AT-specific non intercalating DNA ligands.
Eur. J. Biochem. 54, 385-394 (1975)

Nagley, P. & Linnane, A.W.:
Biogenesis of mitochondria. XXI. Studies on the nature of the mitochondrial genome in yeast:
The degenerative effect of ethidium bromide on mitochondrial genetic information in a respiratory competent strain.
J. Mol. Biol. 66, 181-193 (1972)

Netter, P., Jacq, C.; Carignani, G. & Slonimski, P.P.:
Critical sequences within mitochondrial introns: cis-dominant mutations of the apocytochrome b-like intron of the oxidase gene.
Cell 28, 733-738 (1982)

Nobrega, F.G. & Tzagoloff, A.:
Assembly of the mitochondrial membrane system: DNA sequence and organization of the cytochrome b gene in Saccharomyces cerevisiae D273-10B.
J. Biol. Chem. 255, 9828-9837 (1980)

Nobrega, F.G. & Tzagoloff, A.:
Assembly of the mitochondrial membrane system: Structure and isolation of the mitochondrial glutamic tRNA gene in Saccharomyces cerevisiae.
FEBS LETT. 113, 52-54 (1980)

Novitski, C.E.; Macreadie, I.G.; Maxwell, R.J.; Lukins, H.B.; Linnane, A.W. and Nagley, P.:
Biogenesis of mitochondria: Genetic and Molecular Analysis of the oli2 region of mitochondrial DNA in Saccharomyces cerevisiae.
Current Genetics 8,
pp. 135-146 (1984)

Osinga, K.A.; de Haan, M.; Christianson, T.; Tabak, H.F.:
A nonanucleotide sequence involved in promotion of ribosomal RNA synthesis and RNA priming of DNA replication in yeast mitochondria.
Nucl. Acids Res. 10, 7993-8006 (1982)

Osinga, K.A.; de Vries, E.; van der Horst, G.; Tabak, H.F.:
Processing of yeast mitochondrial messenger RNAs at a conserved dodecamer sequence.
EMBO Journal 3, 829-833 (1984b)

Osinga, K.A.; de Vries, E.; van der Horst, G.T.J. and Tabak, H.F.:
Initiation of transcription in yeast mitochondria: Analysis of origins of replication and of genes coding for a messenger RNA and a transfer RNA.
Nucl. Acids Res. 12, 1889-1900 (1984a)

Pajot, M.; Wambier-Kluppel, M.L.; Kotylak, Z. and Slonimski, P.P.:
Regulation of cytochrome oxidase formation by mutants in a mitochondrial gene for cytochrome b.
In: Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria (Bücher, Th.; Neupert, W.; Sebald, W. and Werner, S., eds.)
North-Holland, Amsterdam, pp. 443-451 (1976)

Putrament, A.; Baranowska, H.; Prazmo, W.:
Induction by manganese of mitochondrial antibiotic resistance mutations in yeast.
Molec. gen. Genet. 126, 357-366 (1973)

Rigby, P.W.; Dieckman, M.; Rhodes, C. and Berg, P.:
Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I.
J. Mol. Biol. 113, 237-251 (1977)

Sanders, J.P.M.; Heyting, C.; Verbeet, M.P.H.; Meijlink, F.C.P.W. and Borst, P.:
The organization of genes in yeast mitochondrial DNA. III. Comparison of the physical maps of the mitochondrial DNAs from three wild-type Saccharomyces strains.
Molec. Gen. Genet. 157, 239-261 (1977)

Schatz, G.; Mason, T.L.:
The biosynthesis of mitochondrial proteins.
Annu. Rew. Biochem. 43, 51-87 (1974)

Schmelzer, C.; Haid, A.; Grosch, G.; Schweyen, R.J.; Kaudewitz, F.:
Pathways of transcript splicing in yeast mitochondria.
J. Biol. Chem. 256, 7610-7619 (1981)

Schmelzer, C. and Schweyen, R.J.:
Evidence for ribosomes involved in splicing of yeast mitochondrial transcripts.
Nucleic Acids Research 10, Number 2, 513-524 (1982)

Schmelzer, C.; Schmidt, C. and Schweyen, R.J.:
Identification of splicing signals in introns of yeast mitochondrial split genes: mutational alteration in intron bI1 and secondary structures in related introns.
Nucl. Acids Res. 10, 6797-6808 (1982)

Schweyen, R.J. & Kaudewitz, F.:
Proteinsynthesis by yeast mitochondria in vivo. Quantitative estimate of mitochondrially governed synthesis of mitochondrial proteins.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 728-735 (1970)

Schweyen, R.J.; Steyrer, U. & Kaudewitz, F.:
Mapping of mitochondrial genes in Saccharomyces cerevisiae.
Molec. Gen. Genet. 146, 117-132 (1976)

Schweyen, R.J.; Weiss-Brummer, B.; Backhaus, B. and Kaudewitz, F.:
The genetic map of the mitochondrial genome of drug resistant and mit^- markers as revealed from population analyses of rho^- clones in Saccharomyces cerevisiae.
Molec. gen. Genet. 159, 151-160 (1978)

Sherman, F.; Steward, J.W.; Parker, J.H.; Inhaber, E.; Shipman, N.A.; Putterman, G.J.; Gardinsky, R.L. and Margoliash, E.:
The mutational alteration of the primary structure of yeast Iso-I-cytochrome c.
J. Biol. Chem. 107, 5446-5456 (1968)

Slonimski, P.P. and Tzagoloff, A.:
Localization in yeast mitochondrial DNA of mutations expressed in a deficiency of cytochromeoxidase and/or coenzyme QH_2-cytochrome-c-reductase.
Eur. J. Biochem. 61, 27-41 (1976)

Slonimski, P.P.; Pajot, P.; Jacq, C.; Foucher, M.; Perrodin, G.; Kochko, A. and Lamouroux, A.:
Mosaic organization and expression of the mitochondrial DNA region controlling cytochrome-c-reductase and oxidase.
I. Genetic, physical and complementation maps of the box region.
In: Biochemistry and Genetics of Yeast: Pure and Applied Aspects (Bacila, M.; Horecker, B.L.; Stoppani, A.O.M., eds.)
New York, Academic Press, pp. 339-368 (1978a)

Slonimski, P.P.; Claisse, M.L.; Foucher, M.; Jacq, C.; Kochko, A.; Lamouroux, A.; Pajot, P.; Perrodin, G.; Spyridakis, A. and Wambier-Kluppel, M.L.:
Mosaic organization and expression of the mitochondrial DNA region controlling cytochrome-c-reductase and oxidase.
III. A model of structure and function.
In: Biochemistry and Genetics of Yeast: Pure and Applied Aspects (Bacila, M.; Horecker, B.L.; Stoppani, A.O.M., eds.)
New York, Academic Press, pp. 391-401 (1978b)

Sor, F. & Fukuhara, H.:
Unequal excision of complementary strands is involved in the generation of palindromic repetitions of rho⁻ mitochondrial DNA in yeast.
Cell 32, 391-396 (1983)

Southern, E.M.:
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.
J. Mol. Biol. 98, 503-517 (1975)

Tabak, H.F.; Hecht, N.B.; Menke, H.H. & Hollenberger, C.P.:
The gene for the small ribosomal RNA on yeast mitochondrial DNA: Physical map, direction of transcription and absence of an intervening sequence.
Curr. Genet. 1, 33-43 (1979)

Van Ommen, G.J.B. and Groot, G.S.P.:
A transcription map of yeast mitochondrial DNA.
In: Mitochondria 1977: Genetics and Biogenesis of Mitochondria (Bandlow, W.; Schweyen, R.J.; Wolf, K. and Kaudewitz, F., eds.)
Berlin: de Gruyter, pp. 415-424 (1977)

Van Ommen, G.J.B.; Groot, G.S.P. and Grivell, L.A.:
Transcription maps of mtDNAs of two strains of Saccharomyces: Transcription of strain-specific insertions; complex RNA maturation and splicing.
Cell 18, 511-523 (1979)

Van Ommen, G.J.B.; Boer, P.H.; Groot, G.S.P.; Haan, M.; Haid, A.; Rosendahl, E.; Schweyen, R.J. and Grivell, L.A.:
Mutations affecting RNA splicing and the interaction of gene expression of the yeast mitochondrial loci COB and OXI3.
Cell 20, 173-183 (1980)

Waring, M.J.:
Structural requirements for the binding of ethidium to nucleic acids.
Biochem. Biophys. Acta 114, 234-244 (1966)

Waring, R.B.; Scazzocchio, C.; Brown, T.A. and Davies, R.W.:
Close relationship between certain nuclear and mitochondrial introns. Implications for the mechanism of RNA splicing.
J. Mol. Biol. 167, 595-605 (1983)

Wayne-Davies, R.; Waring, R.; Ray, J.A.; Brown, T.A.; Scazzocchio, C.:
Making ends meet: a model for RNA splicing in fungal mitochondria.
Nature 300, 719-724 (1982)

Weiss-Brummer, B.; Guba, R.; Haid, A. & Schweyen, R.J.:
Fine structure of OXI1, the mitochondrial gene coding for subunit II of yeast cytochrome c oxidase.
Curr. Gen. Genet. 1, 75-83 (1979)

Weiss-Brummer, B.; Rödel, G.; Schweyen, R.J.; Kaudewitz, F.:
Expression of the split gene cob in yeast: evidence for a precursor of a "maturase" protein translated from intron 4 and preceding exons.
Cell 29, 527-536 (1982)

Weiss-Brummer, B.; Holl, J.; Schweyen, R.J.; Rödel, G. and Kaudewitz, F.:
Processing of yeast mitochondrial RNA: Involvement of intramolecular hybrids in splicing of cob intron 4 RNA by mutation and reversion.
Cell 33, 195-202 (1983)

Wolf, K.; Dujon, B.; Slonimski, P.P.:
Mitochondrial genetics.
V. Multi-factorial crosses involving a mutation conferring paromomycin-resistance in Saccharomyces cerevisiae.
Mol. Gen. Genet. 125, 53-90 (1973)

Zaug, A.J.; Grabowski, P.J. & Cech, T.R.:
Autocatalytic cyclization of an excised intervening sequence RNA is a cleavage-ligation reaction.
Nature 301, 578-583 (1983)

Am Ende dieser Arbeit möchte ich all jenen danken, die an ihrer Entstehung beteiligt waren.

Mein Dank gilt besonders:

- Herrn Prof. Dr. F. Kaudewitz für die Aufgabenstellung, Beratung und großzügige Unterstützung,
- Herrn Prof. Dr. R.J.Schweyen für sein Interesse an den Versuchsergebnissen und seine stete Diskussionsbereitschaft,
- Dr. H.Bruckner für die Bereitstellung von Mutanten,
- Dr. S.Mathews, Dr. C.Schmelzer und Dr. B.Weiss-Brummer für die methodischen Einführungen und die Kooperationsbereitschaft,
- der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Finanzierung,
- meiner Frau May-Britt für ihre unermüdliche Hilfe bei der Fertigstellung der Arbeit

und nicht zuletzt allen Kollegen und Mitarbeitern des Institutes für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

LEBENSLAUF

1950 geboren am 14.2. in München

1970 Abitur in München (math.-naturwiss. Gymnasium)

1970 Herbst: Studienbeginn an der Technischen Universität München
Fachrichtung Biologie und Chemie

1971 Oktober: Grundwehrdienst bis Ende 1972
danach Fortsetzung des Studiums

1976 Anfertigung der Zulassungsarbeit
Fachrichtung Mikrobiologie
Thematik: bakterielle Stoffwechselphysiologie

1978 Wissenschaftliche Prüfung für das höhere Lehramt an Gymnasien in
Biologie und Chemie (Staatsexamen)

1978 Oktober bis 1983 Februar:
angestellt als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Genetik der Universität München
Arbeitsgebiet: Molekulargenetik/Atmungskette
Promotionsbeginn

1983 März bis 1984 März:
angestellt als Nachwuchswissenschaftler von der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH (GSF) München
Arbeitsgebiet: Tumor/Osteosarkome/Retro-Viren

seit April 1984: Fertigstellung meiner Dissertation;

seit 1981 verheiratet